

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 048194

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.06

(21) Номер заявки
202291891

(22) Дата подачи заявки
2020.12.04

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 498/04 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ G12C KRAS

(31) 62/946,586

(32) 2019.12.11

(33) US

(43) 2022.10.07

(86) PCT/US2020/063272

(87) WO 2021/118877 2021.06.17

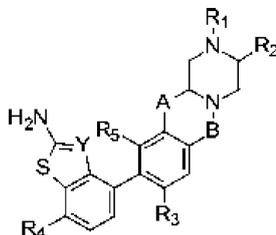
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Буле Серж Луи, Фортнер Кевин
Чарльз, Гуо Декъи, Химэн Дэвид
Майкл, Пэн Шэн-Бинь, Сы Чун (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Прищепный С.В.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(56) WO-A1-2020178282
WO-A1-2018206539
WO-A1-2019215203
US-A1-2009/318412

(57) В настоящем изобретении предложены соединения формулы



где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, A, B и Y имеют значения, описанные в настоящем изобретении, их фармацевтически приемлемые соли и способы применения указанных соединений и солей для лечения рака у пациентов.

048194 B1

048194 B1

Настоящее изобретение относится к новым трициклическим гетероциклическим соединениям и их фармацевтически приемлемым солям, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные трициклические гетероциклические соединения и соли, к способам применения указанных соединений и солей для лечения раковых заболеваний, таких как рак легкого, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, эндометриальный рак, рак яичника, холангиокарцинома или рак пищевода.

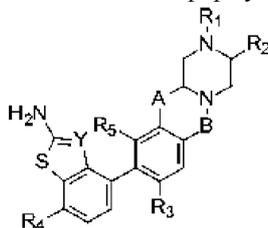
Путь передачи сигналов MAPK/ERK передает внеклеточные стимулы в ядро, регулируя разнообразные клеточные ответы, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клетки. Белок KRas является инициатором пути передачи сигналов MAPK/ERK и действует как переключатель, отвечающий за инициацию клеточного деления. В своем неактивном состоянии KRas связывается с гуанозиндифосфатом (ГДФ), эффективно посылая отрицательный сигнал для подавления клеточного деления. В ответ на внеклеточный сигнал, KRas аллостерически активируется, обеспечивая возможность нуклеотидного обмена ГДФ на гуанозинтрифосфат (ГТФ). В ГТФ-связанном активном состоянии KRas рекрутирует и активирует белки, необходимые для распространения передачи сигналов, индуцированной фактором роста, а также другие сигнальные рецепторы клетки. Примерами белков, рекрутированных KRas-ГТФ, являются c-Raf и PI3-киназа. KRas, будучи ГТФазой, превращает связанный ГТФ обратно в ГДФ, возвращаясь в неактивное состояние и снова распространяя сигналы для подавления клеточного деления. Мутации KRas с приобретением функций демонстрируют повышенную степень связывания ГТФ и сниженную способность к превращению ГТФ в ГДФ. Результатом является усиленный сигнал MAPK/ERK, который ускоряет рост раковых клеток. Миссенс-мутации KRas в 12 кодоне являются наиболее распространенными мутациями, и они заметно снижают активность ГТФазы.

Онкогенные мутации KRas идентифицированы в приблизительно 30% раковых заболеваний человека, и было показано, что они активируют многочисленные нисходящие сигнальные пути. Несмотря на распространенность мутаций KRas, они являются сложной терапевтической мишенью. (Cox, A.D. *Drugging the Undruggable RAS: Mission Possible?* Nat. Rev. Drug Disc. 2014, 13, 828-851; Pylayeva-Gupta, y et al. *RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web.* Nat. Rev. Cancer 2011, 11, 761-774).

В WO 2015/054572 и WO 2016/164675 описаны некоторые хиназолиновые производные, способные связываться с G12C KRas. В WO 2016/044772 также описаны способы применения таких хиназолиновых производных. В WO 2020/0081282 описаны ингибиторы G12C KRas. В WO 2018/206539 и WO 2020/178282 описаны некоторые гетероарильные соединения, способные связываться с белками RAS G12C KRas.

Сохраняется потребность в обеспечении альтернативных низкомолекулярных ингибиторов KRas. В частности, существует потребность в обеспечении более эффективных ингибиторов KRas, пригодных для пероральной доставки, которые подходят для лечения рака. Более конкретно, существует потребность в обеспечении низкомолекулярных ингибиторов, которые специфически ингибируют активность ГТФ KRas. Также существует потребность в обеспечении низкомолекулярных ингибиторов KRas, которые демонстрируют более высокую эффективность при такой же или сниженной ингибирующей активности KRas. Кроме того, существует потребность в обеспечении ингибиторов KRas, которые демонстрируют улучшенные фармакокинетические/фармакодинамические свойства. Также существует потребность в обеспечении более эффективных ингибиторов KRas, которые демонстрируют повышенную эффективность и сниженные или минимизированные неблагоприятные или нежелательные эффекты. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение одной или более из указанных потребностей посредством обеспечения новых ингибиторов KRas.

В настоящем изобретении предложено соединение формулы I:



Формула I

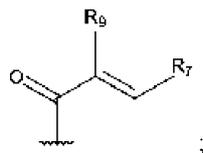
или его фармацевтически приемлемая соль, где:

A представляет собой $-OCH_2-$, $-OCH_2CH_2-$ или $-CH_2OCH_2-$;

B представляет собой $-CH_2-$ или $-C(O)-$;

Y представляет собой $-C(CN)-$ или $-N-$;

R₁ представляет собой $-CN$, $-C(O)C\equiv CR_8$ или группу формулы



R_2 представляет собой H или метил;

R_3 и R_5 , каждый независимо, представляют собой H, галоген или $-C_{1-6}$ алкил;

R_4 представляет собой H или галоген;

R_7 представляет собой H, галоген, $-NR_{11}R_{12}$, $-CH_2NR_{11}R_{12}$, $-C_{1-6}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} или R_{13} , $-C_{0-3}$ алкил-циклопропил или $-O-C_{1-6}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} или R_{13} ;

R_8 представляет собой H, $-C_{1-4}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} , или $-C_{3-6}$ циклоалкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} ;

R_9 представляет собой H, галоген, $-CN$, $-C_{0-3}$ алкил- C_{3-6} циклоалкил или $-C_{1-6}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} ;

R_{10} в каждом случае независимо представляет собой галоген, гидрокси, $-C_{1-4}$ алкил или $-O-C_{1-4}$ алкил;

R_{11} и R_{12} , каждый независимо, представляют собой H, $-C_{1-4}$ алкил или $-C_{1-4}$ гетероалкил, причем R_{11} и R_{12} могут объединяться с атомом азота, к которому они присоединены, с образованием C_{3-6} циклогетероалкила; и

R_{13} в каждом случае независимо представляет собой $-NH-C_{1-4}$ алкил.

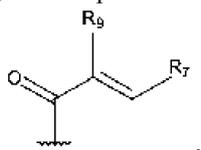
В одном варианте реализации настоящего изобретения А представляет собой $-OCH_2CH_2-$.

В одном варианте реализации настоящего изобретения В представляет собой $-C(O)-$.

В одном варианте реализации настоящего изобретения Y представляет собой $-C(CN)-$.

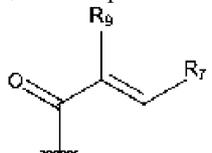
В одном варианте реализации настоящего изобретения Y представляет собой $-N-$.

В одном варианте реализации настоящего изобретения R_1 представляет собой группу формулы



и при этом R_7 представляет собой H, F, Cl, метил, этокси, этил, изопропил или циклопропил.

В одном варианте реализации настоящего изобретения R_1 представляет собой группу формулы



и при этом R_9 представляет собой H, F, Cl, $-CHF_2$, $-CF_3$ или $-CH_2OH$.

В одном варианте реализации настоящего изобретения R_1 представляет собой $-CN-$, $-C(O)C\equiv CR_8$.

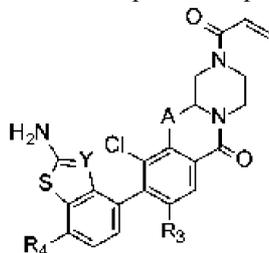
В одном варианте реализации настоящего изобретения R_2 представляет собой H или метил.

В одном варианте реализации настоящего изобретения R_3 представляет собой H, F, Cl, метил, этил, изопропил.

В одном варианте реализации настоящего изобретения R_4 представляет собой H, F или Cl.

В одном варианте реализации настоящего изобретения R_5 представляет собой H.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение формулы



где

А представляет собой $-OCH_2-$ или $-OCH_2CH_2-$;

Y представляет собой $C(CN)$ или N;

R_3 представляет собой Cl или F;

R_4 представляет собой H или F, если Y представляет собой $C(CN)$; и

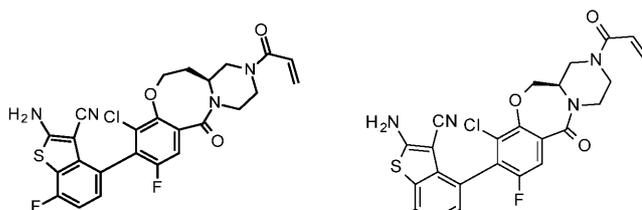
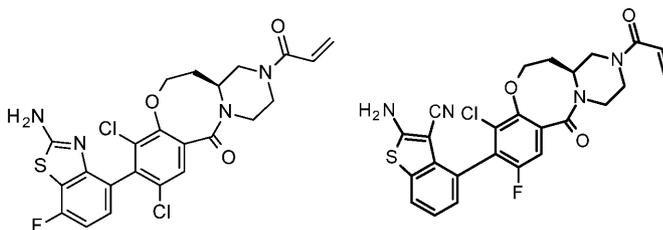
R_4 представляет собой F, если Y представляет собой N,

или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте реализации настоящего изобретения А представляет собой



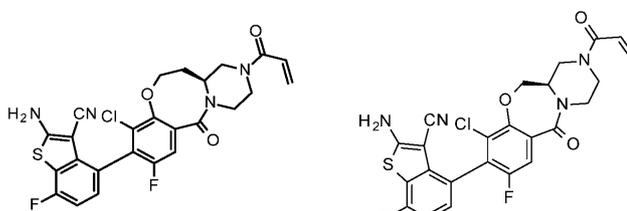
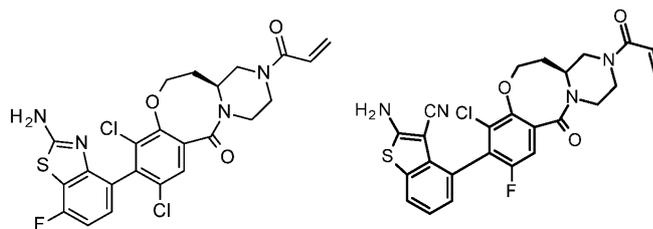
В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, выбранное из:



или

или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой:



или

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества указанной фармацевтической композиции, причем рак выбран из рака легкого, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака пищевода, эндометриального рака, рака яичника, холангиокарциномы и колоректального рака.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли, причем рак выбран из рака легкого, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака пищевода, эндометриального рака, рака яичника, холангиокарциномы и колоректального рака.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, и при этом одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рак представляет собой колоректальный рак, и при этом одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рак представляет собой рак поджелудочной железы, и при этом одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas.

В одном варианте реализации настоящего изобретения пациент болен раком, который, как было установлено, имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas, до введения

предложенного соединения или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения онкологического пациента, имеющего мутацию G12C KRas, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации настоящего изобретения пациенту также вводят эффективное количество одного или более из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1, ингибитора CD4/CDK6 или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора EGFR или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора ERK или его фармацевтически приемлемой соли, агента на основе платины и пеметрекседа или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения рака.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рак выбран из рака легкого, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака пищевода, эндометриального рака, рака яичника, холангиокарциномы и колоректального рака.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации для одновременного, отдельного или последовательного введения с одним или более из ингибитора PD-1 или PD-L1, ингибитора CD4/CDK6 или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора EGFR или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора ERK или его фармацевтически приемлемой соли, агента на основе платины и пеметрекседа или его фармацевтически приемлемой соли, для лечения рака.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли. В различных вариантах реализации рак представляет собой рак легкого, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, эндометриальный рак, рак яичника, холангиокарциному или рак пищевода. В предпочтительных вариантах реализации рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы или колоректальный рак. В более предпочтительных вариантах реализации рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В другой форме настоящее изобретение включает способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли, причем рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой немелкоклеточную карциному легкого, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой колоректальную карциному, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой мутантный рак поджелудочной железы, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает способ лечения раковых заболеваний, несущих мутант G12C KRas, иного происхождения.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения онкологического пациента, имеющего мутацию G12C KRas, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли.

В настоящем изобретении также предложен способ модулирования мутантного фермента G12C KRas у пациента, нуждающегося в этом, посредством введения любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли. Предпочтительно, предложенный способ включает ингибирование мутантного фермента G12C KRas.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, причем указанный пациент болен раком, который, как было установлено, экспрессирует мутантный белок G12C KRas. Предложенный способ включает введение пациенту эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли. Мутационный статус G12C одной или более раковых клеток может быть установлен многими анализами, известными в данной области техники. Обычно получают одну или более биопсий, содержащих одну или более раковых клеток, и подвергают секвенированию и/или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Также можно использовать циркулирующую бесклеточную ДНК, например, при запущенном раке. Неограничивающие примеры технологий секвенирования и ПНР, используемых для определения мутационного статуса (например, мутационного статуса G12C в одной или более раковых клетках или в циркулирующей бесклеточной ДНК), включают прямое секвенирование, секвенирование следующего поколения, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), мультиплексную ПЦР, а также пиросеквенирование и профилирование множества анализируемых образцов.

В настоящем изобретении также предложено соединение или его фармацевтически приемлемая

соль в соответствии с любой из формул I-VI для применения в терапии. Предложенное соединение или его фармацевтически приемлемая соль могут быть использованы для лечения рака. Предпочтительно, рак представляет собой рак легкого, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, эндометриальный рак, рак яичника, холангиокарциному или рак пищевода. В предпочтительных вариантах реализации рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы или колоректальный рак. В более предпочтительных вариантах реализации рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В других вариантах реализации рак имеет одну или более раковых клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. Предпочтительно, рак выбран из: немелкоклеточного рака легкого с мутантным G12C KRas, колоректального рака с мутантным G12C KRas и рака поджелудочной железы с мутантным G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, и одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой колоректальный рак, и одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой рак поджелудочной железы, и одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации пациент болен раком, который, как было установлено, имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas, до введения предложенного соединения или его фармацевтически приемлемой соли.

В настоящем изобретении также предложено применение любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения рака. Предпочтительно, рак представляет собой рак легкого, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, эндометриальный рак, рак яичника, холангиокарциному или рак пищевода. В предпочтительных вариантах реализации рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы или колоректальный рак. В более предпочтительных вариантах реализации рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В других вариантах реализации рак имеет одну или более раковых клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. Предпочтительно, рак выбран из немелкоклеточного рака легкого с мутантным G12C KRas, колоректального рака с мутантным G12C KRas и рака поджелудочной железы с мутантным G12C KRas.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли и одного или более из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1, ингибитора CD4/CDK6 или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора EGFR или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора ERK или его фармацевтически приемлемой соли, агента на основе платины и пеметрекседа или его фармацевтически приемлемой соли, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В настоящем изобретении также предложено любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемая соль для применения в комбинации для одновременного, раздельного или последовательного введения с одним или более из ингибитора PD-1 или PD-L1, ингибитора CD4/CDK6 или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора EGFR или его фармацевтически приемлемой соли, агента на основе платины и пеметрекседа или его фармацевтически приемлемой соли, для лечения рака. В настоящем изобретении также предложена комбинация, содержащая любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемую соль и один или более из ингибитора PD-1 или PD-L1, ингибитора CD4/CDK6 или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора EGFR или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора ERK или его фармацевтически приемлемой соли, агента на основе платины и пеметрекседа или его фармацевтически приемлемой соли, для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли, и ингибитора PD-1 или PD-L1, причем рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В настоящем изобретении также предложено любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемая соль для применения в комбинации для одновременного, раздельного или последовательного введения с ингибитором PD-1 или PD-L1, для применения для лечения рака. В настоящем изобретении также предложена комбинация, содержащая любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1 или PD-L1, для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака. В одном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы I-VI или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте реализации ингибитор PD-1 или PD-L1 представляет собой пембролизумаб. В другом варианте реализации ингибитор PD-1 или PD-L1 представляет собой ниволумаб. В другом варианте реализации ингибитор PD-1 или PD-L1 представляет собой цимиблимаб. В другом варианте реализации ингибитор PD-1 или PD-L1 представляет собой атезолизумаб. В другом варианте реализации ингибитор PD-1 или PD-L1 представляет собой авелумаб. В другом варианте реализации ингибитор PD-1 или PD-L1 представляет собой дурвалумаб. В другом варианте реализации ингибитор PD-1 или

LTT462. В другом варианте реализации ингибитор ERK представляет собой КО-947. В другом варианте реализации рак представляет собой немелкоклеточную карциному легкого, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой колоректальную карциному, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой мутантный рак поджелудочной железы, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает способ лечения раковых заболеваний, несущих мутант G12C KRas, иного происхождения.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли, и агента на основе платины, причем рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В настоящем изобретении также предложено любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемая соль для применения в комбинации для одновременного, раздельного или последовательного введения с агентом на основе платины или его фармацевтически приемлемой солью, для лечения рака, причем рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В настоящем изобретении также предложена комбинация, содержащая любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемую соль и агент на основе платины, для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака. В другом варианте реализации агент на основе платины представляет собой цисплатин. В другом варианте реализации агент на основе платины представляет собой карбоплатин. В другом варианте реализации агент на основе платины представляет собой оксалиплатин. В другом варианте реализации рак представляет собой немелкоклеточную карциному легкого, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой колоректальную карциному, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой мутантный рак поджелудочной железы, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает способ лечения раковых заболеваний, несущих мутант G12C KRas, иного происхождения.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемой соли, и пеметрекседа, причем рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В настоящем изобретении также предложено любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемая соль для применения в комбинации для одновременного, раздельного или последовательного введения с пеметрекседом, для лечения рака, причем рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В настоящем изобретении также предложена комбинация, содержащая любое из раскрытых соединений или его фармацевтически приемлемую соль и пеметрексед, для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака, причем рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой немелкоклеточную карциному легкого, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации пациенту также вводят агент на основе платины. В другом варианте реализации агент на основе платины представляет собой цисплатин. В другом варианте реализации агент на основе платины представляет собой карбоплатин. В другом варианте реализации агент на основе платины представляет собой оксалиплатин. В другом варианте реализации рак представляет собой колоректальную карциному, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации рак представляет собой мутантный рак поджелудочной железы, причем указанный рак имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas. В другом варианте реализации настоящее изобретение включает способ лечения раковых заболеваний, несущих мутант G12C KRas, иного происхождения.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" в данном контексте относится к соли соединения, которая считается приемлемой для клинического и/или ветеринарного применения. Примеры фармацевтически приемлемых солей и общие методики их получения представлены в публикациях "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" P. Stahl, et al, 2e пересмотренное издание, Wiley-VCH, 2011, и S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, 66(1), 1-19.

Фармацевтические композиции для настоящего изобретения могут быть получены с применением фармацевтически приемлемых добавок. Термин "фармацевтически приемлемая добавка(и)", используемый в данном контексте для фармацевтических композиций, относится к одному или более носителям, разбавителям и вспомогательным веществам, которые совместимы с другими добавками композиций или лекарственной формы и не вредны для пациента. Примеры фармацевтических композиций и способов их получения представлены в публикации "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Loyd, V., et al. ред., 22^е изд., Mack Publishing Co., 2012. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и вспомогательных веществ включают: солевой раствор, воду, крахмал, сахара,

маннит и производные диоксида кремния; связующие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон; каолин и бентонит; и полиэтиленгликоли.

В данном контексте термин "эффективное количество" относится к определенному количеству, которое является дозой, эффективным для лечения расстройства или заболевания, такого как раковое поражение или прогрессирование патологического роста клеток и/или деления клеток. Лечащий врач, как специалист в данной области техники, может без труда определить эффективное количество, используя стандартные технологии и изучая результаты, полученные в аналогичных обстоятельствах. Суточные дозы во время лечения обычно находятся в диапазоне от примерно 1 мг в сутки или два раза в сутки до 1000 мг в сутки или два раза в сутки, более предпочтительно от 100 мг в сутки или два раза в сутки до 900 мг в сутки или два раза в сутки. Факторы, учитываемые при определении эффективного количества или дозы соединения, включают: тот факт, является ли вводимое соединение таковым или его солью; совместное введение других агентов, в случае их использования; биологический вид пациента, подлежащего лечению; размер, возраст и общее состояние здоровья пациента; степень вовлеченности или стадии, и/или тяжести расстройства; ответ конкретного пациента; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему введения доз; и применение другого сопутствующего лечения.

Лечащий врач, ветеринар или другой медицинский работник могут определить эффективное количество соединения для лечения пациента, нуждающегося в этом. Предпочтительные фармацевтические композиции могут быть составлены в форму таблетки или капсулы для перорального введения, раствора для перорального введения или раствора для инъекций. Таблетка, капсула или раствор может содержать соединение согласно настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения пациента, нуждающегося в лечении рака.

В данном контексте термины "лечить", "лечит" или "лечение" включают замедление, ослабление или реверсирование развития или тяжести существующего симптома, расстройства, патологического состояния, которое может включать, в частности, замедление роста ракового поражения или прогрессирования патологического роста клеток и/или деления клеток.

В данном контексте термин "пациент" относится к млекопитающему, нуждающемуся в лечении. Предпочтительно, пациентом является человек, нуждающийся в лечении рака, например, рака, несущего мутантный G12C KRas.

Ниже приведено определение некоторых сокращений: "ACN" относится к ацетонитрилу; "AIBN" относится к азобисизобутиронитрилу; "Woc-Gly-OH" относится к N-(трет-бутоксикарбонил)глицину; "ДХМ" относится к дихлорметану; "DIEA" относится к N,N-диизопропилэтиламину; "DMAP" относится к 4-диметиламинопиридину;

"DMEM" относится к среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко; "DMФА" относится к N,N-диметилформамиду; "DMCO" относится к диметилсульфоксиду; "ДНК" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте; "DPEPhosPdCl₂" относится к дихлорбис(дифенилфосфинофенил)эфиру палладия (II); "ДТТ" относится к дитиотреитолу; "ЭДТК" относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; "ЭГТК" относится к этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоте; "ELISA" относится к фермент-связанному иммуносорбентному анализу; "ERK" относится к киназам, регулируемым внеклеточными сигналами; "EtOAc" относится к этилацетату; "EtOH" относится к этанолу; "FBS" относится к эмбриональной бычьей сыворотке; "ГДФ" относится к гуанозиндифосфату; "ГТФ" относится к гуанозинтрифосфату; "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; "HRP" относится к пероксидазе хрена; "IPA" относится к изопропиловому спирту; "IPAm" относится к изопропиламину; "ЖХ-ЭР/МС" относится к жидкостной хроматомасс-спектрометрии с электрораспылением; "ЖХ-МС" относится к жидкостной хроматомасс-спектрометрии; "МАРК" относится к митоген-активируемой протеинкиназе; "MeOH" относится к метанолу; "NaOMe" относится к метоксиду натрия; "NBS" относится к N-бромсукцинимиду; "NCS" относится к N-хлорсукцинимиду; "NMP" относится к 1-метилпирролидин-2-ону; "ПЦР" относится к полимеразной цепной реакции; "RPMI" относится к Онкологическому институту Розуэлла Парка; "SCX" относится к сильному катионному обмену; "ТЭА" относится к триэтиламину; "ТФК" относится к трифторуксусной кислоте; и "ТГФ" относится к тетрагидрофурану.

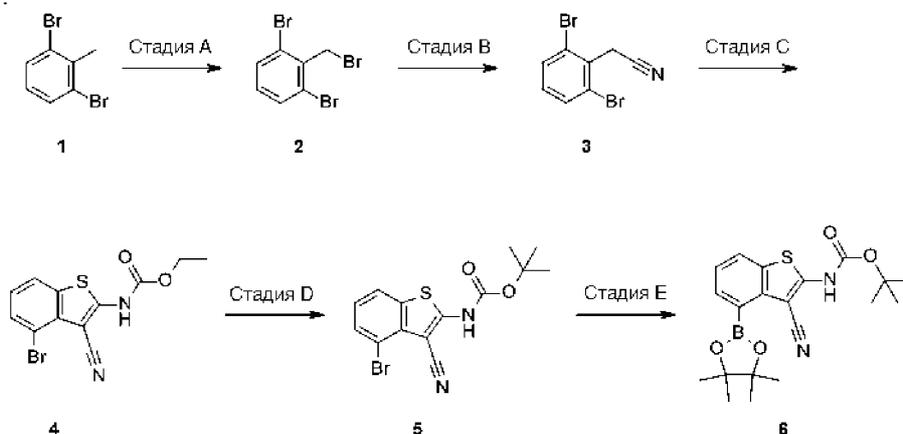
Отдельные изомеры, энантиомеры, диастереомеры и атропизомеры могут быть выделены или разделены на любой удобной точке синтеза соединений, представленных ниже, такими способами как технологии селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel and S.H. Wilen", Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Настоящее изобретение включает некоторые соединения, которые являются атропизомерами и которые могут существовать в различных конформациях или в форме различных ротомеров. Атропизомеры представляют собой соединения, которые существуют в различных конформациях, возникающих в результате ограниченного вращения вокруг одинарной связи. Атропизомеры могут быть выделены в виде отдельных химических веществ, если энергетический барьер для вращения вокруг одинарной связи является достаточно высоким, а скорость взаимного превращения является достаточно низкой для обеспечения возможности отделения отдельных ротомеров друг от друга. Настоящее изобретение включает все изомеры, энантиомеры, диастереомеры и атропизо-

меры, описанные в настоящем документе, или те, которые могут быть получены с использованием соединений, описанных в настоящем документе.

Любое из раскрытых соединений можно без труда преобразовать и выделить в форме фармацевтически приемлемой соли. Образование соли может происходить при добавлении фармацевтически приемлемой кислоты с получением соли присоединения кислоты. Соли также могут образовываться одновременно со снятием защиты с атома азота или кислорода, т.е. при удалении защитной группы. Примеры, реакции и условия получения солей представлены в публикациях Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33.: 201-217 (1986); Bastin, R.J., et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); и Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977).

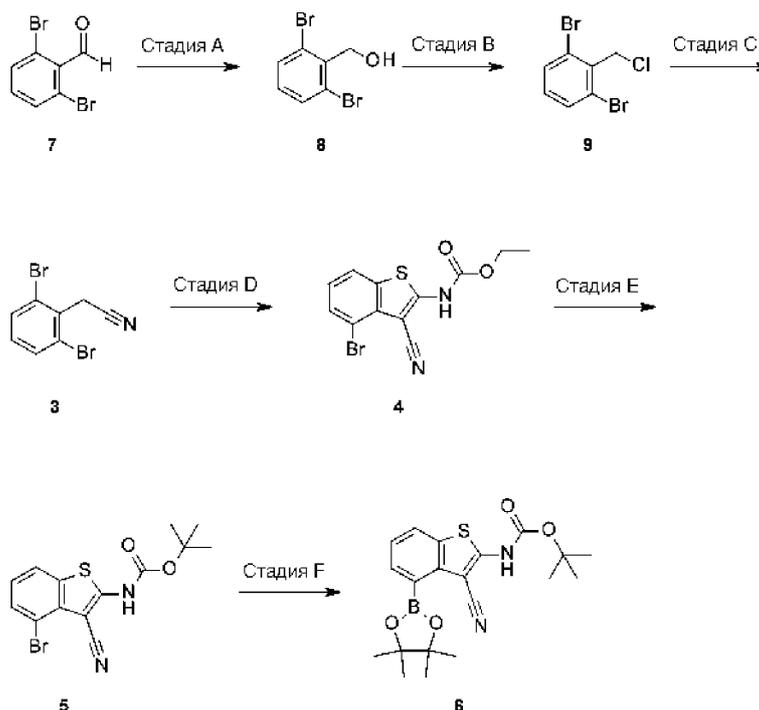
Соединения согласно настоящему изобретению или их соли могут быть получены различными способами, некоторые из которых представлены ниже в разделе "Подготовительные синтезы и примеры". Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно различным образом комбинировать или сочетать со стадиями других способов для получения соединений или солей согласно настоящему изобретению. Продукты каждой стадии, представленной ниже в разделе "Подготовительные синтезы", можно выделять обычными способами, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрацию, растирание и кристаллизацию.

Схема 1.



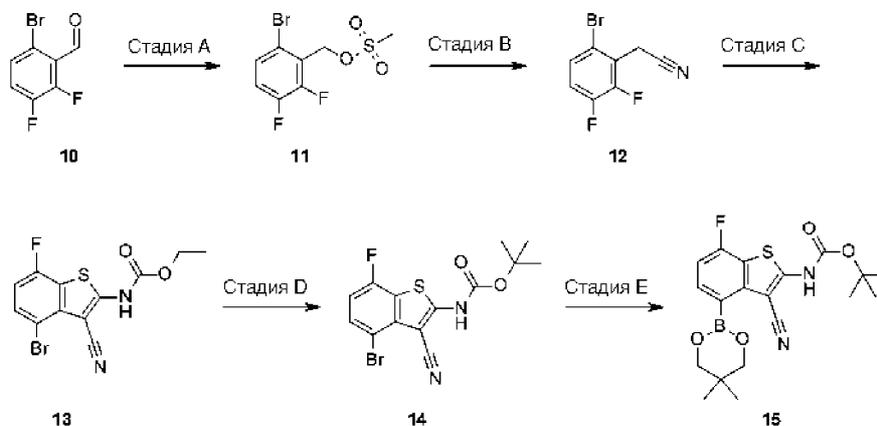
На схеме 1 на стадии А показано бромирование соединения (1) с применением NBS и АТВН в подходящем растворителе, таком как ССЦ, с получением соединения (2). На стадии В показано нуклеофильное замещение в соединении (2) с применением цианида калия при кипении с обратным холодильником в подходящей системе растворителей, такой как EtOH и вода, с получением соединения (3). Присоединение этоксикарбонилгидрида натрия к соединению (3) с применением гидрида натрия в подходящем растворителе, таком как ДМФА, и последующая циклизация до соединения (4) показаны на стадии С. Снятие защиты с соединения (4) в основных условиях с применением водного раствора NaOH в кипящем с обратным холодильником ДМСО и последующая повторная защита с применением ди-трет-бутилдикарбоната с подходящим основанием, таким как DIEA, и каталитическим DMAP, в системе растворителей, такой как ТГФ и ДМФА, с получением соединения (5) показаны на стадии D. На стадии E показана реакция брома в соединении (5) с бис(пинаколато)дибором с применением подходящего основания, такого как ацетат калия, и системы на основе катализатора и лиганда, такой как ацетат палладия и 1,1'-бис(диизопропилфосфино)ферроцен, в подходящем растворителе, таком как 1,4-диоксан, с получением соединения (6). Специалистам в данной области техники понятно, что для осуществления указанной реакции можно использовать различные комбинации катализатора и лиганда.

Схема 2.



На схеме 2 показан альтернативный способ синтеза соединения (6). На стадии А показано восстановление бензальдегида (7) с применением подходящего восстановительного агента, такого как боргидрид натрия, в подходящем растворителе, таком как EtOH, с получением соединения (8). На стадии В показано хлорирование соединения (8) с применением тионилхлорида в подходящем растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (9). На стадии С показано нуклеофильное замещение в соединении (9) с применением цианида калия в подходящем растворителе, таком как ДМСО, с получением соединения (3). Присоединение этоксикарбонилзотиоцианата к соединению (3) с применением гидрида натрия в подходящем растворителе, таком как ДМФА и последующая циклизация с применением L-пролина и CuI с получением соединения (4) показаны на стадии D. Снятие защиты с соединения (4) в основных условиях с применением водного NaOH в кипящем с обратным холодильником ДМСО и последующая повторная защита с применением ди-трет-бутилдикарбоната с подходящим основанием, таким как DIEA, и каталитическим DMAP, в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (5) показаны на стадии E. На стадии F показана реакция брома в соединении (5) с бис(пинаколато)дибором с применением подходящего основания, такого как ацетат калия, и системы на основе катализатора и лиганда, такой как ацетат палладия и бис(2-дифенилфосфинофенил)эфир, в подходящем растворителе, таком как 1,4-диоксан, с получением соединения (6). Специалистам в данной области техники понятно, что для осуществления указанной реакции можно использовать различные комбинации катализатора и лиганда.

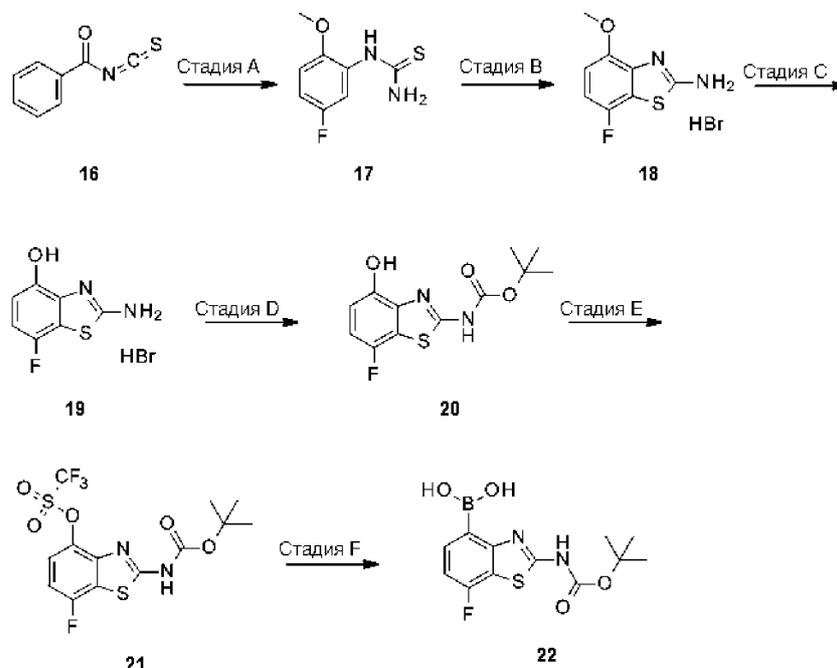
Схема 3.



На стадии А схемы 3 показано восстановление альдегида в соединении (10) с применением боргидрида натрия в MeOH и последующее метилирование с применением метансульфонового ангидрида с подходящим основанием, таким как DIEA, в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (11). Условия, используемые для превращения соединения (11) в соединение (12) по существу аналогичны условиям, представленным на стадии В схемы 1. Присоединение этоксикарбонилзотиоцианата к

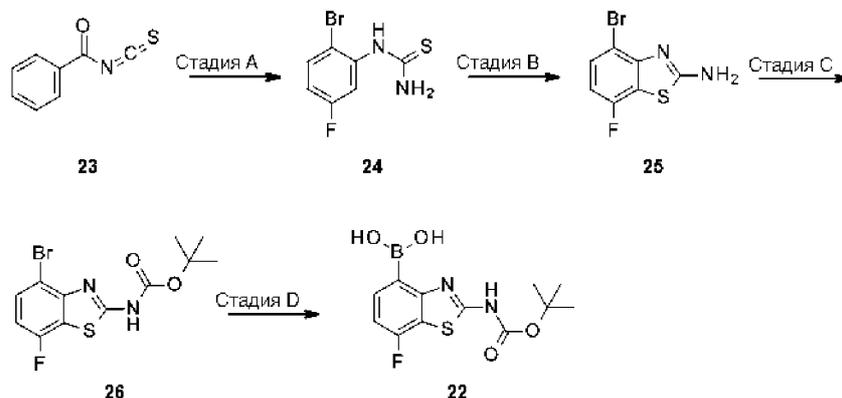
соединению (12) с применением трет-бутоксид калия в подходящем растворителе, таком как ДМФА, и последующая циклизация до соединения (13) показаны на стадии С. Условия, используемые для превращения соединения (13) в соединение (14) по существу аналогичны условиям, представленным на стадии D схемы 1. На стадии E показана реакция брома в соединении (14) с бис(неопентилгликолято)дибором с применением подходящего основания, такого как ацетат калия, и системы на основе катализатора и лиганда, такой как DPEPhosPdCl₂, в подходящем растворителе, таком как 1,4-диоксан, с получением соединения (15). Специалистам в данной области техники понятно, что для осуществления указанной реакции можно использовать различные комбинации катализатора и лиганда.

Схема 4.



На стадии А схемы 4 показано образование тиомочевины посредством взаимодействия соединения (16) и 5-фтор-2-метоксианилина при поддержании пониженной температуры реакции, с последующим снятием защиты в основных условиях с получением соединения (17). На стадии В показана циклизация соединения (17) в хлороформе после присоединения брома с получением соединения (18). На стадии С показано деметилирование соединения (18), которое может быть осуществлено посредством добавления VBr₃ при поддержании низкой температуры реакционной смеси в инертной атмосфере с получением соединения (19). На стадии D показана защита соединения (19) с помощью ди-трет-бутилдикарбоната с применением подходящего основания, такого как ТЭА, и каталитического DMAP, в системе растворителя, такой как 1,4-диоксан, с получением соединения (20). Соединение (20) обрабатывают основанием, таким как пиридин, затем трифторметансульфовым ангидридом в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (21), как показано на стадии E. На стадии F показана реакция трифлата соединения (21) с бис(пинаколато)дибором с применением подходящего основания, такого как ацетат калия, и катализатора, такого как тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0), в подходящем растворителе, таком как 1,4-диоксан, с получением соединения (22). Специалистам в данной области техники понятно, что для осуществления указанной реакции можно использовать различные комбинации катализатора и лиганда.

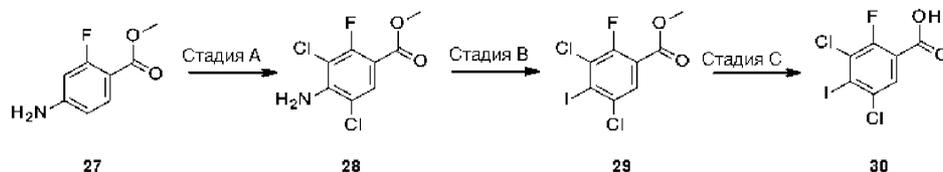
Схема 5.



На схеме 5 показан альтернативный способ синтеза соединения (22). На стадии А показано образование тиомочевины по реакции соединения (23) и 2-бром-5-фторанилина в растворителе, таком как ТГФ,

с последующим снятием защиты в основных условиях с получением соединения (24). На стадии В показано бромирование и циклизация соединения (24) с применением подходящего бромирующего агента, такого как трибромид пиридиния, в растворителе, таком как серная кислота, с получением соединения (25). На стадии С показана защита соединения (25) с помощью ди-трет-бутилдикарбоната с применением подходящего основания, такого как DMAP, в системе растворителя, такой как ДХМ, с получением соединения (26). На стадии D показано превращение соединения (26) в соединение (22) посредством обработки гидридом натрия в растворителе, таком как ТГФ, при низких температурах с последующим добавлением н-бутиллития и триизопропилбората.

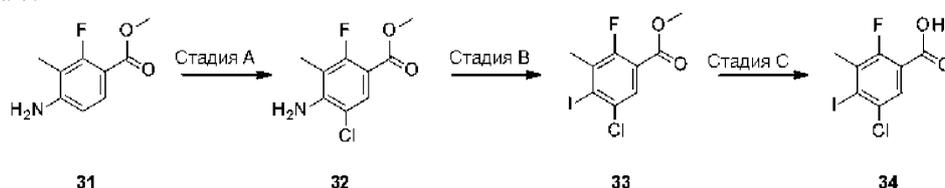
Схема 6.



На стадии А схемы 6 показано хлорирование соединения (27) с применением NCS в подходящем растворителе, таком как ДМФА, с получением соединения (28). На стадии

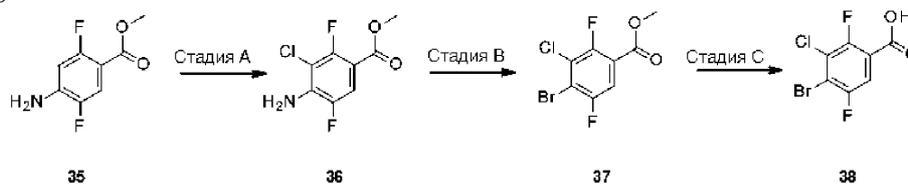
В показана реакция Зандмейера для замены анилинового азота в соединении (28) на иод, условия которой известны специалистам в данной области техники, с получением соединения (29). На стадии С показан основной гидролиз сложного эфира в соединении (29) до кислоты в соединении (30).

Схема 7.



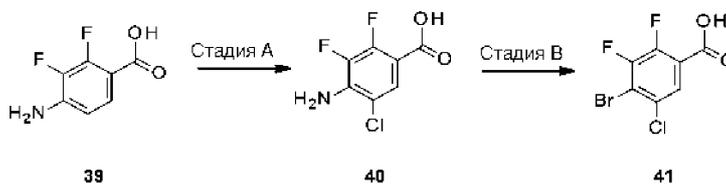
Стадии А-С схемы 7 осуществляют по существу аналогично способам, представленным на стадиях А-С схемы 6, с получением соединений (32-34).

Схема 8



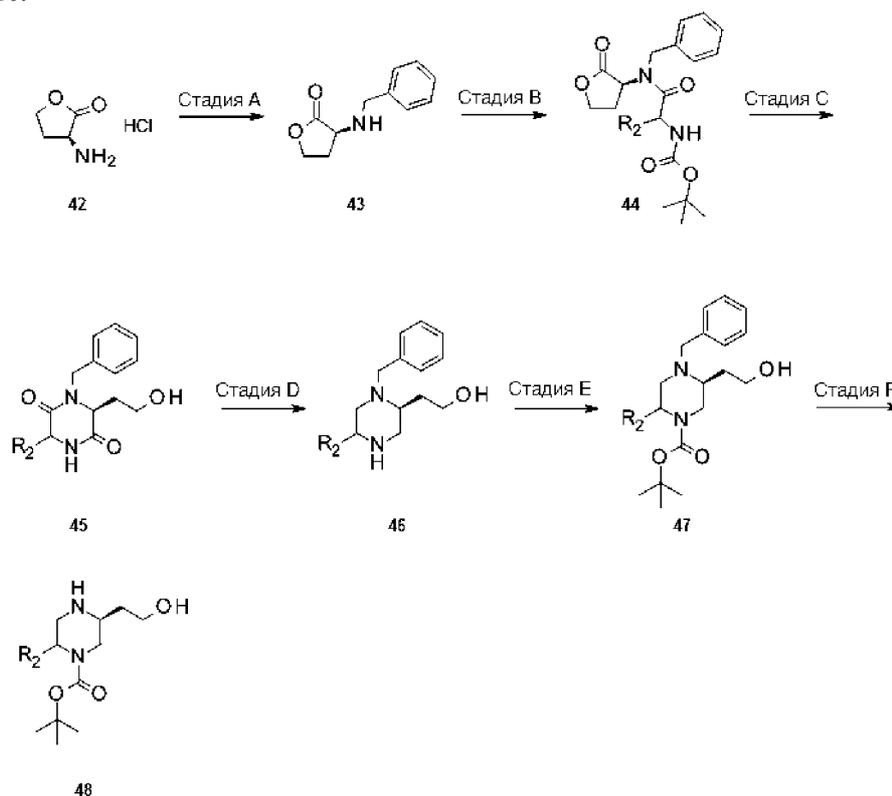
Стадию А схемы 8 осуществляют по существу аналогично способу, описанному на стадии А схемы 6, с получением соединения (36). На стадии В показана реакция Зандмейера для замены анилинового азота в соединении (36) на бром, условия которой известны специалистам в данной области техники, с получением соединения (37). Стадию С осуществляют по существу аналогично способу, описанному на стадии С схемы 6, с получением соединения (38).

Схема 9.



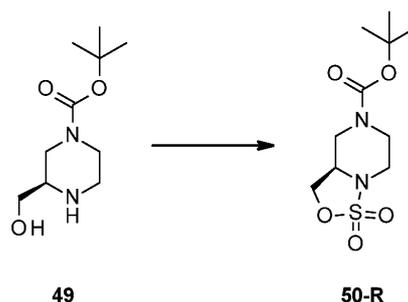
Стадию А схемы 9 осуществляют по существу аналогично способу, описанному на стадии А схемы 6, с получением соединения (40). Стадию В осуществляют по существу аналогично способу, описанному на стадии В схемы 8, с получением соединения (41).

Схема 10.



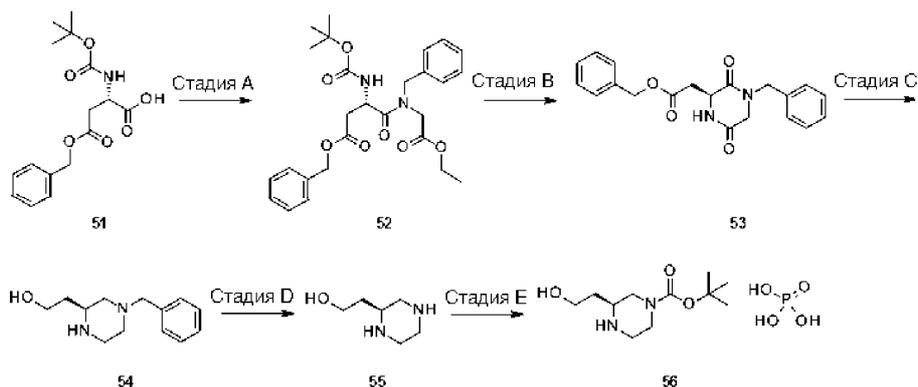
На стадии А схемы 10 показано восстановительное аминирование между соединением (42) и бензальдегидом в подходящем растворителе, таком как ДХМ, с подходящим восстановительным агентом, таким как триацетоксиборгидрид натрия, с получением соединения (43). На стадии В показано амидное связывание между соединением (43) и *о*-защищенной аминокислотой с применением пропилфосфонового ангидрида с подходящим основанием, таким как ТЭА, в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (44). На стадии С показано снятие защиты в кислотных условиях и перегруппировка соединения (44) с применением ТФК в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (45). На стадии D показано комплексное восстановление амидов в соединении (45) с применением восстановительного агента, такого как алюмогидрид лития, в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (46). На стадии Е показана защита соединения (46) с помощью ди-трет-бутилдикарбоната в водном растворе бикарбоната натрия с получением соединения (47). На стадии F показано снятие защиты с соединения (47) посредством гидрирования с получением соединения (48).

Схема 11.



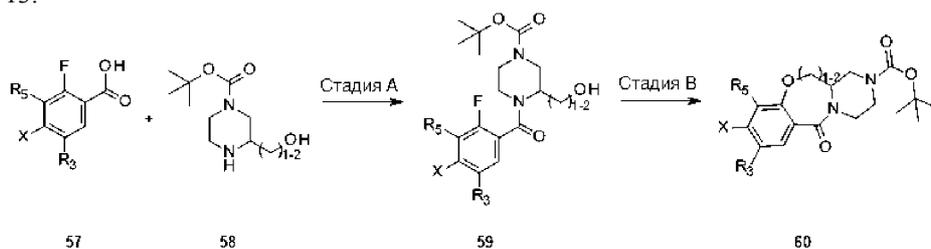
На схеме 11 показана циклизация соединения (49) с применением тионилхлорида и имидазола в растворителе, таком как ДХМ, при -78°C с последующей обработкой периодатом натрия и хлоридом рутения (III) в ACN с получением соединения (50-R). *S*-энантиомер (50-S) синтезируют в таких же условиях.

Схема 12.



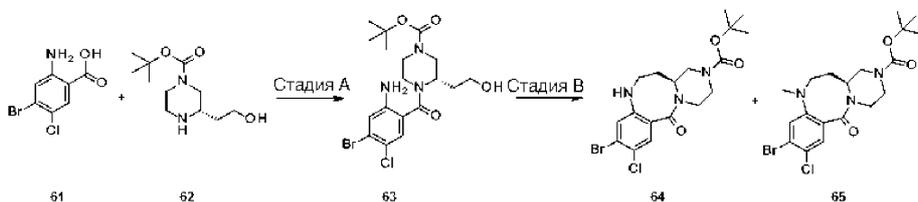
На стадии А схемы 12 показано амидное связывание между соединением (51) и этиловым эфиром бензилглицина с применением подходящего связующего агента, такого как N,N'-дициклогексилкарбодиимид, в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (52). На стадии В показана циклизация соединения (52) до соединения (53) с применением кислоты, такой как ТФК, в растворителе, таком как ДХМ. На стадии С показано комплексное восстановление амидов и снятие защиты в соединении (53) с применением восстановительного агента, такого как алюмогидрид лития, в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (54). На стадии D показано гидрирование соединения (54) до соединения (55) с применением подходящего катализатора, такого как Pd(OH)₂, в растворителе, таком как MeOH. На стадии Е показано введение ди-трет-бутилдикарбонатной защитной группы в соединении (55) и последующей образование соли с фосфорной кислотой с получением соединения (56).

Схема 13.



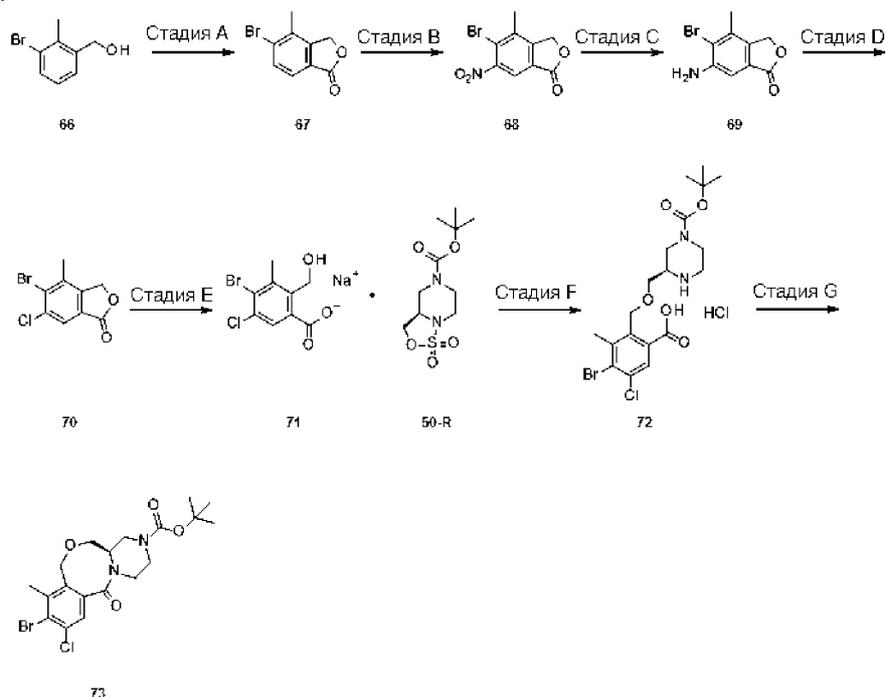
На схеме 13 соединение (57) представляет собой бензойные кислоты из схем 6-9, а также доступные в продаже бензойные кислоты. Амидное связывание между соединением (57) и соединением (58) с применением NATU и подходящего основания, такого как DIEA, в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (59) представлено на стадии А. Альтернативно, амидное связывание осуществляют с применением 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триамина и подходящего основания, такого как 4-метилморфолин, в растворителе, таком как ТГФ. Специалистам в данной области техники понятно, что существует множество условий, в которых можно осуществлять амидное связывание. На стадии В показана внутримолекулярная циклизация соединения (59) до соединения (60) с применением подходящего основания, такого как гидрид натрия, в растворителе, таком как ДМФА.

Схема 14.



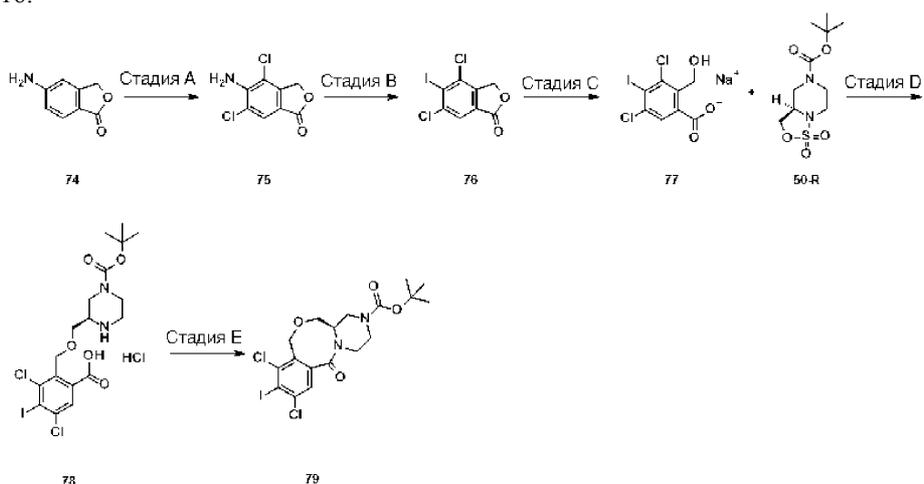
Стадию А схемы 14 осуществляют по существу аналогично способу, описанному на стадии А схемы 13, с получением соединения (63). Стадия В состоит из циклизации соединения (63), осуществляемой по существу аналогично способу, описанному на стадии В схемы 13, с последующим метилированием с применением метилиодида. После указанной стадии выделяют соединения (64) и (65).

Схема 15.



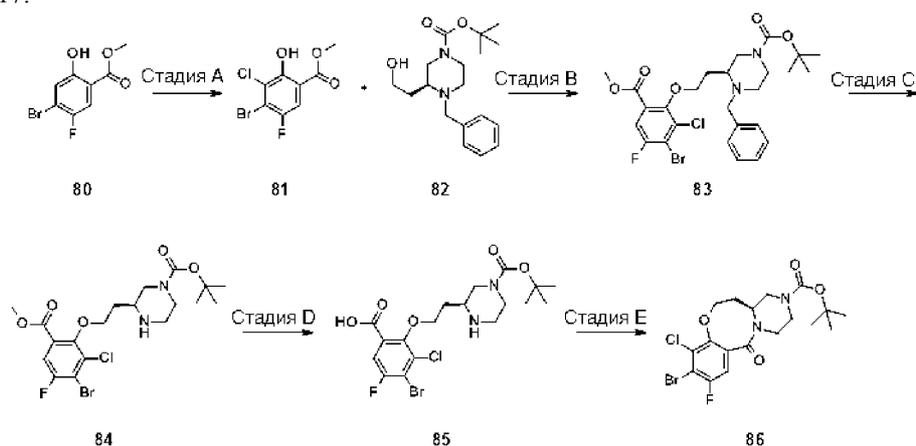
На стадии А схемы 15 показана циклизация соединения (66) посредством обработки трифторацетатом таллия (III) в ТФК с последующим добавлением оксида магния, хлорида лития и MeOH с катализатором, таким как хлорид палладия (II), в атмосфере монооксида углерода с получением соединения (67). На стадии В показано нитрование соединения (67) с применением нитрата калия в концентрированной серной кислоте с получением соединения (68). Гидрирование нитрогруппы в соединении (68) с применением Pt/C в системе растворителей, такой как ДХМ и ТФК, с получением соединения (69) показано на стадии С. На стадии D показана реакция Зандмейера для замены анилинового азота в соединении (69) на хлор, условия которой известны специалистам в данной области техники, с получением соединения (70). На стадии E показан гидролиз соединения (70) с применением подходящего основания, такого как водный NaOH, при нагревании с получением соединения (71). Алкилирование соединения (71) соединением (50-R) с применением подходящего основания, такого как NaNH, в системе растворителей, такой как ДМФА и ТГФ, с получением соединения (72) показано на стадии F. На стадии G показано внутримолекулярное amidное связывание в соединении (72) с применением NATU и подходящего основания, такого как DIEA, в растворителе, таком как ДМФА с получением соединения (73).

Схема 16.



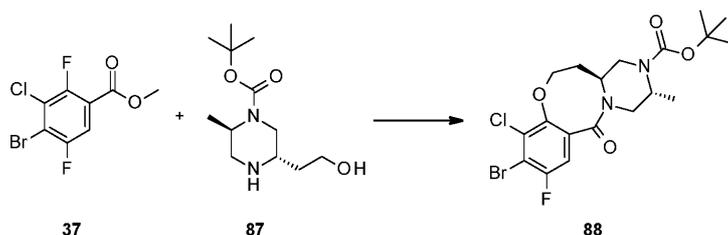
Стадию А схемы 16 осуществляют по существу аналогично способу, описанному на стадии А схемы 6, с получением соединения (75). На стадии В показана реакция Зандмейера для замены анилинового азота в соединении (75) на иод, условия которой известны специалистам в данной области техники, с получением соединения (76). Стадии С-Е осуществляют по существу аналогично способу, описанному на стадиях Е-Г схемы 15, с получением соединений (77-79).

Схема 17.



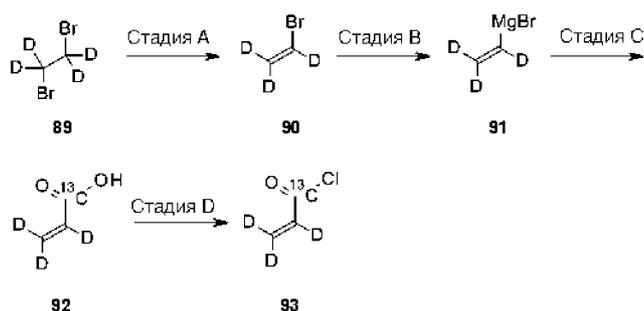
На стадии А схемы 17 показано хлорирование соединения (80) подходящим хлорирующим агентом, таким как NCS, в подходящем растворителе, таком как уксусная кислота, при нагревании с получением соединения (81). На стадии В показана реакция Мицунобу между соединениями (81) и (82) с применением трифенилфосфина и диизопропилазодикарбоксилата в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (83). На стадии С показано дебензилирование соединения (83) с применением диизопропиламина и 1-хлорэтилхлорформиата в подходящем растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (84). На стадии D показан основной гидролиз сложного эфира в соединении (84) с применением подходящего основания, такого как гидроксид лития, в системе растворителей, такой как ТГФ и вода, с получением соединения (85). Внутримолекулярное амидное связывание в соединении (85) с применением пропилфосфонового ангидрида с подходящим основанием, таким как ТЭА, в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (86) показано на стадии Е.

Схема 18.



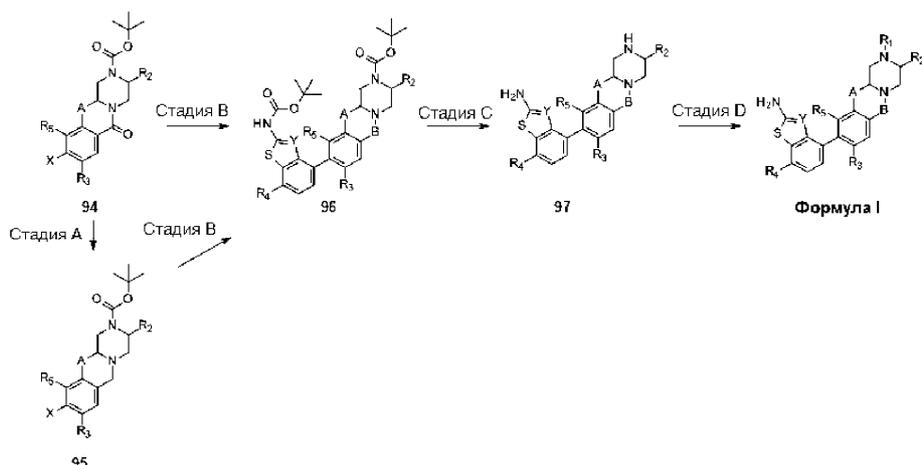
На схеме 18 показано связывание соединения (37) и соединения (87) и последующая циклизация с получением соединения (88) с применением подходящего основания, такого как карбонат цезия, в растворителе, таком как ДМФА, при нагревании.

Схема 19.



На стадии А схемы 19 показано превращение соединения (89) в соединение (90) посредством обработки подходящим основанием, таким как КОН, в системе растворителей, такой как дейтерированный EtOH в D_2O . На стадии В показана реакция Гриньяра соединения (90) с магнием в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (91). Карбоксилирование соединения (91) с помощью $^{13}\text{CO}_2$ в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (92) показано на стадии С. На стадии D показана реакция соединения (92) с оксалилхлоридом в растворителе, таком как ДХМ, с каталитическим ДМФА с получением соединения (93).

Схема 20.



На схеме 20 соединение (94) представляет собой трициклические ядра, описанные на схемах 13-18. На стадии А амид в соединении (94) восстанавливают с помощью подходящего восстановительного агента, такого как комплекс борана с диметилсульфидом, в ТГФ с получением соединения (95). Соединение (94) и соединение (95) можно подвергать перекрестному сочетанию Сузуки с боронатами, как описано на схемах 1-5, с использованием подходящего катализатора, такого как дихлорид 1,1'-бис(ди-трет-бутилфосфино)ферроценпалладия, с подходящим основанием, таким как трехосновный фосфат калия, в системе растворителей, такой как 1,4-диоксан и вода, при нагревании с получением соединения (96). Альтернативно, такое сочетание можно осуществлять с применением подходящего катализатора, такого как DPEPhosPdCl₂, с основанием, таким как карбонат цезия, в растворителе, таком как толуол, при нагревании. Специалистам в данной области техники понятно, что существует множество комбинаций катализатора, основания и растворителя, которые можно использовать для осуществления такого типа превращения. На стадии С показано кислотное снятие защиты с соединения (96) с помощью кислоты, такой как ТФК, в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (97). На стадии D показано связывание между соединением (97) и партнером с получением соединений формулы I. Партнер может представлять собой хлорангидрид кислоты, карбоновую кислоту или бромистый циан. В случае с хлорангидридом кислоты используют подходящее основание, такое как ТЭА или DIEA, в растворителе, таком как ДХМ. Хлорангидрид кислоты также можно использовать с карбонатом калия в качестве основания в двухфазной системе растворителей, такой как EtOAc, ТГФ и вода. В тех случаях, в которых партнером является карбоновая кислота, условия включают подходящий связывающий реагент, такой как пропилфосфоновый ангидрид, с подходящим основанием, таким как DIEA, в растворителе, таком как ДМФА. Если партнером является бромистый циан, используют подходящее основание, такое как водный NaOH, в растворителе, таком как ДХМ.

Подготовительные синтезы и примеры

В следующем разделе "Подготовительные синтезы и примеры" представлена дополнительная иллюстрация настоящего изобретения и приведены типичные способы синтеза соединений согласно настоящему изобретению, но их никоим образом не следует толковать как ограничение объема настоящего изобретения. Реагенты и исходные материалы являются легкодоступными или могут быть без труда синтезированы либо известными способами, либо с использованием различных модификаций, которые могут быть сделаны специалистом в данной области техники.

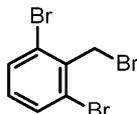
Соединения могут быть охарактеризованы с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии с электрораспылением (ЖХ-ЭР/МС), осуществляемой на системе для жидкостной хроматографии Agilent HP1100. Измерения масс-спектрометрии с электрораспылением (записанные в положительном и/или отрицательном режиме) проведены на квадрупольном масс-спектрометре с масс-селективным детектором, подключенном к системе ВЭЖХ HP1100. Условия для ЖХ-МС (низкий pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C-18 2,1×50 мм, 3,0 мкм; градиент: 5-100% В за 3 минуты, затем 100% В в течение 0,75 мин, температура колонки: 50°C +/-10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; растворитель А: деионизированная вода с 0,1% HCOOH, растворитель В: ACN с 0,1% муравьиной кислоты; длина волны 214 нм. Альтернативные условия для ЖХ-МС (высокий pH): колонка: колонки WATERS™ XTERRA® MS C-18, 2,1×50 мм, 3,5 мкм; градиент: 5% растворителя А в течение 0,25 мин, градиент от 5% до 100% растворителя В за 3 минуты и 100% растворителя В в течение 0,5 мин, или от 10% до 100% растворителя В за 3 мин и 100% растворителя В в течение 0,75 мин; температура колонки: 50°C +/-10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; растворитель А: 10 мМ NH₄HCO₃ pH 9; растворитель В: ACN; длина волны: 214 нм.

Препаративную обращенно-фазовую хроматографию проводили на системе ЖХ-ЭР/МС Agilent 1200, оснащенной масс-спектрометром с масс-селективным детектором и автоматическим пробоотборником/сборником фракций Leap. Методы при высоком pH осуществляли на колонке 75×30 мм PHE-

NOMENEX® GEMINI®-NX с размером частиц 5 мкм с защитой 10×20 мм. Скорость потока 85 мл/мин. В качестве элюента использовали 10 мМ бикарбонат аммония (pH 10) в ACN.

Подготовительный синтез 1.

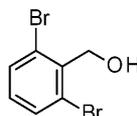
1,3-Дибром-2-(бромметил)бензол.



NBS (35,0 г, 195 ммоль) добавляли к раствору 2,6-дибромтолуола (50,0 г, 194 ммоль) в четыреххлористом углероде (500 мл). Нагревали смесь до 80°C и добавляли AIBN (3,20 г, 19,1 ммоль). Кипятили смесь с обратным холодильником в течение 16 часов. По истечении указанного времени охлаждали смесь до комнатной температуры и фильтровали. Разбавляли фильтрат EtOAc и промывали водой, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток сушили под высоким вакуумом с получением указанного в заголовке соединения (67,5 г, 84%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,58 (2H, д), 7,04 (1H, м), 4,86 (2H, с).

Подготовительный синтез 2.

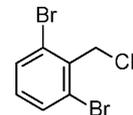
2,6-Дибромфенил)метанол.



Боргидрид натрия (7,83 г, 207 ммоль) добавляли тремя порциями с интервалами по 10 мин к охлажденному до 0°C перемешиваемому раствору 2,6-дибромбензальдегида (148,7 г, 552,3 ммоль) в EtOH (1,4 л). После последнего добавления перемешивали смесь в течение 30 мин, затем осторожно гасили насыщенным водным раствором NH₄Cl (600 мл). Добавляли ДХМ (1,75 л) и воду (200 мл) и разделяли слои. Водный слой еще раз экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и фильтровали через слой диоксида кремния, промывая EtOAc (2×500 мл). Концентрировали фильтрат в вакууме, растворяли в толуоле и снова концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (148,7 г, 99%). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,66 (2H, д), 7,17 (1H, м), 5,20 (1H, м), 4,74 (2H, д).

Подготовительный синтез 3.

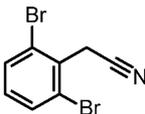
1,3-Дибром-2-(хлорметил)бензол.



К охлажденному до 0°C раствору (2,6-дибромфенил)метанола (199,3 г, 749,4 ммоль) в ДХМ (1,5 л), обработанном ДМФА (0,5 мл), по каплям добавляли тионилхлорид (160 мл, 2196 ммоль) в течение 1 ч. По истечении указанного времени оставляли смесь нагреваться до комнатной температуры и затем нагревали до 50°C в течение ночи. Убирали нагрев и охлаждали реакционную смесь до 0°C, затем осторожно гасили водой (500 мл). Разбавляли смесь ДХМ и разделяли слои. Органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, водой и снова насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке продукта в виде белого твердого вещества (206,98 г, 95%). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,75 (2H, д), 7,26 (1H, м), 4,95 (2H, с).

Подготовительный синтез 4.

2-(2,6-Дибромфенил)ацетонитрил.



Смесь 1,3-дибром-2-(бромметил)бензола (57,0 г, 137 ммоль) и цианида калия (28,0 г, 417 ммоль) в EtOH (350 мл) и воде (90 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 5 ч. Затем охлаждали смесь до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Растворяли остаток в EtOAc и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Водную фазу экстрагировали EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 10-100% смесью ДХМ/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (34,5 г, 87%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,62 (2H, д), 7,12 (1H, м), 4,14 (2H, с).

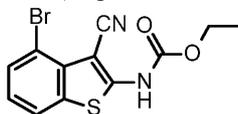
Альтернативный подготовительный синтез 4.

Цианид калия (142,2 г, 2183,5 ммоль) добавляли к раствору 1,3-дибром-2-(хлорметил)бензола

(206,98 г, 727,83 ммоль) в ДМСО (600 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней. По истечении указанного времени выливали смесь в ледяную воду и перемешивали 2 ч, в течение которых образовался белый осадок. Отфильтровывали осадок и три раза промывали водой, затем сушили в вакуумной печи. Полученное твердое вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя 10-70% смесью ДХМ/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (189,23 г, 94%). ^1H ЯМР (ДМСО- d_6) δ 7,78 (2H, д), 7,28 (1H, м), 4,22 (2H, с).

Подготовительный синтез 5.

Этил-N-(4-бром-3-цианобензотиофен-2-ил)карбамат.



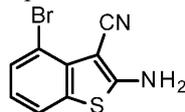
Раствор 2-(2,6-дибромфенил)ацетонитрила (20,0 г, 71,3 ммоль) в ДМФА (200 мл) охлаждали до 0°C. По частям добавляли гидрид натрия (60 мас.% в парафиновом масле) (2,85 г, 71,3 ммоль). После добавления перемешивали смесь при 0°C в течение 10 мин, затем по каплям добавляли этоксикарбонилзотиоцианат (8,60 мл, 71,4 ммоль) при 0-5°C. После добавления перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 ч, затем нагревали при 100°C в течение 4 часов. По истечении указанного времени выпаривали растворитель в вакууме. Перемешивали остаток в смеси EtOAc и насыщенного раствора бикарбоната натрия. Полученный осадок собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакуумной печи при 60-65°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (10,5 г, 45%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 322,8/324,8 [M-H].

Альтернативный подготовительный синтез 5.

Гидрид натрия (60 мас.% в парафиновом масле) (24,85 г, 621,3 ммоль) суспендировали в ДМФА (500 мл) и охлаждали до 0°C. К холодной суспензии по каплям добавляли раствор 2-(2,6-дибромфенил)ацетонитрила (169,14 г, 615,19 ммоль) в ДМФА (600 мл) в течение 1 ч так, чтобы температура не поднималась выше 7°C. Через 30 мин добавляли этоксикарбонилзотиоцианат (77,81 мл, 646,0 ммоль) в течение 30 мин при 0°C. Перемешивали смесь при 0°C в течение 10 мин, затем снимали с ледяной бани и перемешивали еще 20 мин. По истечении указанного времени добавляли L-пролин (14,16 г, 123,0 ммоль) и иодид меди (I) (11,71 г, 61,49 ммоль) и нагревали смесь до 65°C в течение 4,5 ч. Обрабатывали смесь 0,5 М водным раствором ЭДТК (4 л), разбавляли EtOAc (1,6 л) и энергично перемешивали в течение ночи. По истечении указанного времени фильтровали полученную мутную взвесь и промывали собранное твердое вещество водой и EtOAc. Твердое вещество сушили под вакуумом в течение 1,5 ч, затем сушили в вакуумной печи еще 2 ч с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (187,24 г, 77%). ^1H ЯМР (ДМСО- d_6) δ 11,76 (1H, с), 8,01 (1H, д), 7,65 (1H, д), 7,27 (1H, м), 4,90 (2H, к), 1,31 (3H, м).

Подготовительный синтез 6.

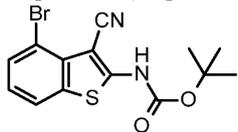
2-Амино-4-бромбензотиофен-3-карбонитрил.



5 н. NaOH (765 мл, 3825 ммоль) добавляли к раствору этил-N-(4-бром-3-цианобензотиофен-2-ил)карбамата (155 г, 476,6 ммоль) в ДМСО (480 мл). Нагревали смесь до 125°C в течение ночи. По истечении указанного времени убирали нагрев и выливали реакционную смесь в ледяную воду (4,2 л) и энергично перемешивали в течение 10 мин. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакуумной печи в течение 2 дней с получением указанного в заголовке продукта в виде желтого твердого вещества (73,6 г, 61%). ^1H ЯМР (ДМСО- d_6) δ 7,96 (2H, с), 7,70 (1H, д), 7,46 (1H, д), 7,02 (1H, м).

Подготовительный синтез 7.

трет-Бутил-N-(4-бром-3-цианобензотиофен-2-ил)карбамат.



Раствор 2-амино-4-бромбензотиофен-3-карбонитрила (20 г, 79,2 ммоль), DIEA (21 мл, 120 ммоль) и DMAP (800 мг, 6,55 ммоль) в ТГФ (270 мл) и ДМФА (40 мл) обрабатывали ди-трет-бутилдикарбонатом (19,6 г, 87,1 ммоль). Перемешивали смесь в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь разбавляли водой, раствором бикарбоната натрия и EtOAc, затем перемешивали в течение 10 мин. Полученный осадок собирали фильтрацией, промывали холодным EtOAc и сушили в вакуумной печи при 60°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения в виде бежевого твердого вещества (10,8 г, 38,6%). Дополнительно дважды экстрагировали фильтрат EtOAc. Объемные органические экстракты промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия,

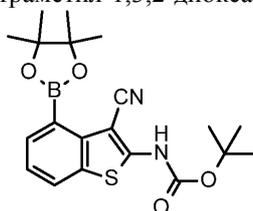
сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 20-100% смесью ДХМ/гексан, с получением дополнительного количества соединения (12,5 г, 45%), общий выход составил 23,3 г (83%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 351/353 [M-H].

Альтернативный подготовительный синтез 7.

DIEA (77 мл, 441 ммоль) и DMAP (2 г, 16 ммоль) добавляли к раствору 2-амино-4-бромбензотиофен-3-карбонитрила (74,5 г, 294 ммоль) в ТГФ (2 л), затем добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (73,1 г, 325 ммоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. По истечении указанного времени разбавляли смесь водой, EtOAc и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, затем фильтровали с получением почти белого твердого вещества. Полученное твердое вещество промывали водой и EtOAc, затем сушили в течение ночи с получением указанного в заголовке продукта (32 г, 31%). Затем разделяли слои фильтрата и дважды экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток растворяли в ДХМ (260 мл), обрабатывали ультразвуком, дополнительно разбавляли гексанами (275 мл), обрабатывали ультразвуком, растирали и фильтровали с получением дополнительного количества указанного в заголовке продукта (60,5 г, 58%), и общий выход составил 92,5 г (89%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 351/353 [M-H].

Подготовительный синтез 8.

трет-Бутил-N-[3-циано-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензотиофен-2-ил]карбамат.



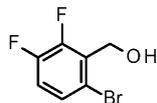
Раствор трет-бутил-N-(4-бром-3-цианобензотиофен-2-ил)карбамата (10,90 г, 30,7 ммоль), бис(пинаколато)дибора (23,50 г, 92,54 ммоль) и ацетата калия (9,05 г, 92,2 ммоль) в 1,4-диоксане (150 мл) продували азотом при 50°C в течение 30 мин. В колбу загружали 1,1'-бис(диизопропилфосфино)ферроцен (2,25 г, 5,38 ммоль) и ацетат палладия (0,700 г, 3,12 ммоль) и затем нагревали при 100°C в атмосфере азота. Через 2 ч охлаждали смесь до комнатной температуры, разбавляли EtOAc, фильтровали через диатомовую землю и промывали EtOAc. Обрабатывали фильтрат силикагелем (150 г), концентрировали досуха и затем загружали в картридж. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-50% смесью ДХМ/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (9,15 г, 67%). ЭР/МС m/z: 399,2 (M-H).

Альтернативный подготовительный синтез 8.

1,4-Диоксан (500 мл) нагревали до кипения с обратным холодильником, пропуская азот, в течение 1 ч. Затем понижали температуру до 80°C, продолжая продувать азотом. При указанной температуре добавляли трет-бутил-N-(4-бром-3-цианобензотиофен-2-ил)карбамат (32 г, 90,59 ммоль), бис(пинаколато)дибор (60 г, 236 ммоль), ацетат калия (26,67 г, 271,8 ммоль) и, наконец, ацетат палладия (2,03 г, 9,04 ммоль) и бис(2-дифенилфосфино)фенил эфир (8,54 г, 15,9 ммоль). Нагревали смесь при 100°C в течение трех часов. По истечении указанного времени убирали нагрев и разбавляли смесь EtOAc, фильтровали через диатомовую землю и концентрировали в вакууме. Растворяли полученный остаток в ДХМ, обрабатывали 200 г диоксида кремния и концентрировали в вакууме. Диоксид кремния помещали в предколону и очищали материал хроматографией на силикагеле, элюируя 10-95% ДХМ и предварительно смешанным 95% раствором ДХМ/EtOAc. Полученные фракции разделяли на основании относительной чистоты. Каждую часть по отдельности концентрировали в вакууме, обрабатывали ультразвуком в гептанах, растирали, фильтровали и промывали гептанами. Полученные твердые вещества сушили в течение ночи, затем объединяли с получением указанного в заголовке соединения (23,86 г, 65%). ^1H ЯМР (DMCO- d_6) δ 11,32 (1H, c), 8,02 (1H, d), 7,59 (1H, d), 7,34 (1H, m), 1,53 (9H, c), 1,37 (12H, c).

Подготовительный синтез 9.

6-Бром-2,3-дифторбензальдегид.

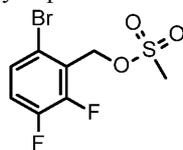


6-Бром-2,3-дифторбензальдегид (20,0 г, 88,7 ммоль) растворяли в MeOH (250 мл) и по частям добавляли боргидрид натрия (6,70 г, 177 ммоль). После охлаждения экзотермической реакции до комнатной температуры (~1 ч) выливали реакционную смесь в насыщенный раствор хлорида аммония и три раза экстрагировали ДХМ. Объединенные органические экстракты промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в

вакууме. Сушили остаток под высоким вакуумом в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (19,5 г, 97%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,37 (1H, м), 7,07 (1H, м), 4,88 (2H, м), 2,13 (1H, м).

Подготовительный синтез 10.

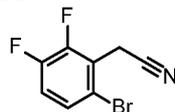
(6-Бром-2,3-дифторфенил)метилметансульфонат.



6-Бром-2,3-дифторбензолметанол (19,5 г, 85,7 ммоль) растворяли в ТГФ (200 мл) и добавляли DIEA (18,0 мл, 103 ммоль). Охлаждали смесь до 0°C и затем обрабатывали метансульфоновым ангидридом (17,1 г, 94,2 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 18 ч полученную смесь разбавляли смесью EtOAc:метил-трет-бутиловый эфир (1:1) и промывали холодной водой. Разделяли слои и дважды экстрагировали водный слой смесью EtOAc:метил-трет-бутиловый эфир (1:1). Объединенные органические слои промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом магния и карбонатом калия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого маслянистого вещества (26,0 г, 99+%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,44 (1H, м), 7,18 (1H, м), 5,43 (2H, д), 3,12 (3H, с).

Подготовительный синтез 11.

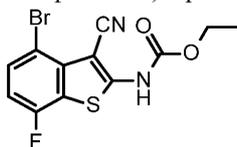
2-(6-Бром-2,3-дифторфенил)ацетонитрил.



Смесь (6-бром-2,3-дифторфенил)метилметансульфоната (26,0 г, 82,0 ммоль) и цианида калия (6,06 г, 90,3 ммоль) в EtOH (200 мл) и воде (40,0 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин и затем охлаждали до комнатной температуры. Удаляли растворитель в вакууме и суспендировали остаток в ДХМ. Промывали смесь водой, насыщенным раствором бикарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 10-100% смесью ДХМ/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (17,9 г, 94%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,44 (1H, м), 7,15 (1H, м), 3,91 (2H, д).

Подготовительный синтез 12.

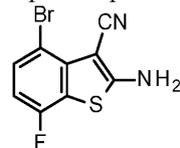
Этил-N-(4-бром-3-циано-7-фторбензотиофен-2-ил)карбамат.



Раствор 2-(6-бром-2,3-дифторфенил)ацетонитрила (17,9 г, 77,2 ммоль) в ДМФА (200 мл) охлаждали на ледяной бане и затем обрабатывали трет-бутоксидом калия (9,30 г, 81,2 ммоль), который добавляли по частям. После добавления перемешивали смесь в течение 10 мин (реакционная смесь стала темно-красной) и по каплям добавляли этоксикарбонилзотиоцианат (9,80 мл, 81,4 ммоль). Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 ч и затем нагревали при 100°C в течение 30 мин. Затем охлаждали смесь на ледяной бане в течение 10 мин и медленно добавляли воду (500 мл) при перемешивании. Полученный осадок собирали фильтрацией, промывали водой и гексанами и сушили на воздухе. Твердое вещество дополнительно сушили в вакуумной печи при 60°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (24,5 г, 84%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 340,8/342,8 [M-H].

Подготовительный синтез 13.

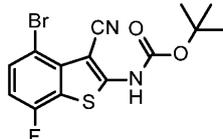
2-Амино-4-бром-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил.



Смесь этил-N-(4-бром-3-циано-7-фторбензотиофен-2-ил)карбамата (24,5 г, 71,4 ммоль), ДМСО (100 мл) и 5 н. NaOH (80,0 мл, 400 ммоль) кипятили с обратным холодильником в течение 4 часов. Охлаждали смесь до комнатной температуры и обрабатывали холодной водой при энергичном перемешивании. Полученный осадок собирали фильтрацией, промывали водой и сушили в вакуумной печи при 65°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (15,5 г, 80%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 268,8/270,8 [M-H].

Подготовительный синтез 14.

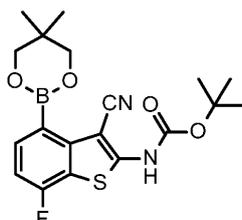
трет-Бутил-N-(4-бром-3-циано-7-фторбензотиофен-2-ил)карбамат.



Указанное в заголовке соединение получали из 2-амино-4-бром-7-фторбензотиофен-3-карбонитрила способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 7. ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 314,8/316,8 [M-t-Bu+H] $^{+}$.

Подготовительный синтез 15.

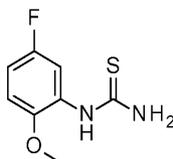
трет-Бутил-N-[3-циано-4-(5,5-диметил-1,3,2-диоксаборинан-2-ил)-7-фторбензотиофен-2-ил]карбамат.



трет-Бутил-N-(4-бром-3-циано-7-фторбензотиофен-2-ил)карбамат (16,0 г, 41,4 ммоль) и бис(неопентилгликолято)дифтор (37,0 г, 157 ммоль) растворяли в 1,4-диоксане (300 мл) в атмосфере азота. Добавляли ацетат калия (12,2 г, 124 ммоль) и продували смесь азотом в течение 1 ч при 50°C. Добавляли DPEPhosPdCl₂ (3,0 г, 4,2 ммоль) и нагревали колбу при 95°C в течение 1 ч. Затем охлаждали смесь до комнатной температуры, концентрировали в вакууме до ~100 мл, разбавляли гептаном (200 мл), перемешивали в течение 10 мин и затем фильтровали через диатомовую землю, промывая гептаном и смесью гептан:метил-трет-бутиловый эфир (1:1). Концентрировали фильтрат, растворяли в минимальном количестве ДХМ и фильтровали через слой силикагеля, промывая смесь EtOAc:гептан (1:1). Промывали фильтрат насыщенным раствором хлорида аммония и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очищали остаток колоночной флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 5-50% смесью (20% ацетона в ДХМ)/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (13,0 г, 78%). ¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 11,6 (1H, c), 7,61 (1H, м), 7,20 (1H, м), 3,78 (4H, c), 1,54 (9H, c), 1,03 (6H, c).

Подготовительный синтез 16.

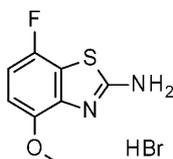
(5-Фтор-2-метоксифенил)тиомочевина.



Бензоилизотиоцианат (110 г, 671 ммоль) и ТГФ (875 мл) объединяли и охлаждали до 5°C в атмосфере азота. По каплям добавляли 5-фтор-2-метоксианилин (83,2 мл, 705 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру реакции ниже 10°C. Нагревали смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 мин. Добавляли 5 н. NaOH (161 мл, 805 ммоль) и воду (200 мл) и нагревали смесь до кипения с обратным холодильником в течение 3,5 ч. По истечении указанного времени добавляли воду (500 мл) и изопропилацетат (800 мл) и охлаждали смесь до комнатной температуры. Добавляли концентрированный водный раствор HCl для доведения pH до ~9-10. Разделяли слои. Сушили органический слой над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. К остатку добавляли EtOAc (360 мл) и гексаны (840 мл) и кипятили смесь с обратным холодильником в течение пяти минут. По истечении указанного времени охлаждали смесь до -20°C и оставляли отстаиваться в течение ночи. Полученное твердое вещество отфильтровывали и промывали собранное твердое вещество холодными гексанами с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (118 г, 88%). ЭР/МС m/z: 201 (M+H).

Подготовительный синтез 17.

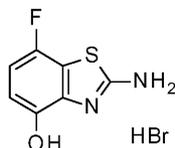
Гидробромид 7-фтор-4-метокси-1,3-бензотиазол-2-амина.



Раствор (5-фтор-2-метоксифенил)тиомочевины (118 г, 571 ммоль) и CHCl_3 (2 л) охлаждали до 5°C в атмосфере азота. По каплям добавляли бром (30,1 мл, 582 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру реакции ниже 7°C . Перемешивали смесь при 0°C в течение 30 мин, затем нагревали при кипении с обратным холодильником в течение 2,25 ч. По истечении указанного времени охлаждали смесь до -20°C и оставляли отстаиваться в течение ночи. Полученное твердое вещество отфильтровывали и промывали холодными гексанами с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (141 г, 89%). ЭР/МС m/z: 199 (M+H).

Подготовительный синтез 18.

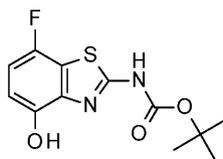
Гидробромид 2-амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ола.



VBr_3 (150 мл, 1589 ммоль) через канюлю добавляли в ДХМ (1,5 л) при 0°C в атмосфере азота. По частям добавляли гидробромид 7-фтор-4-метокси-1,3-бензотиазол-2-амин (141 г, 506 ммоль) в течение 15 мин и оставляли реакционную смесь медленно нагреваться до комнатной температуры и при перемешивании в течение ночи. Охлаждали смесь до 0°C и осторожно гасили MeOH , поддерживая внутреннюю температуру ниже 10°C . Во время гашения выходящий поток газа пропускали через холодный 5 н. раствор NaOH . Полученное твердое вещество отфильтровывали и промывали холодным ДХМ с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (117 г, 87%). ЭР/МС m/z: 185 (M+H).

Подготовительный синтез 19.

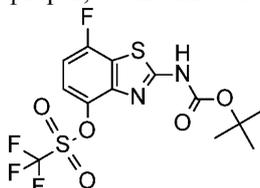
трет-Бутил-(7-фтор-4-гидрокси-1,3-бензотиазол-2-ил)карбамат.



Гидробромид 2-амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ола (117 г, 441 ммоль) в 1,4-диоксане (1,5 л) охлаждали до 10°C . Добавляли ТЭА (129 мл, 926 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру реакции ниже 15°C . Добавляли DMAP (2,7 г, 22 ммоль) и ди-трет-бутилдикарбонат (228 г, 1014 ммоль) и медленно нагревали реакционную смесь до комнатной температуры, и перемешивали в течение двух дней. Разбавляли смесь водой, EtOAc и насыщенным водным раствором хлорида натрия и разделяли слои. Органический слой концентрировали в вакууме. Добавляли MeOH (900 мл) и NaOMe (5 М в MeOH , 132 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли дополнительное количество NaOMe (5 М в MeOH , 10 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение трех часов, затем концентрировали в вакууме. Добавляли воду и EtOAc и разделяли слои. Органический слой сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме до образования твердого вещества. Добавляли гексаны и отфильтровывали полученное твердое вещество, и промывали гексанами с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (97,2 г, 78%). ЭР/МС m/z: 283 (M-H).

Подготовительный синтез 20.

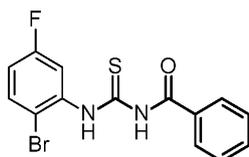
2-[(трет-Бутоксикарбонил)амино]-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил, трифторметансульфонат.



трет-Бутил-(7-фтор-4-гидрокси-1,3-бензотиазол-2-ил)карбамат (116 г, 407 ммоль), ДХМ (1,4 л) и пиридин (66 мл, 814 ммоль) объединяли и охлаждали до 5°C в атмосфере азота. По каплям добавляли трифторметансульфоновый ангидрид (83 мл, 488 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру реакции ниже 10°C . Разбавляли смесь водой и разделяли слои. Органический слой промывали 10% водным раствором лимонной кислоты. Органический слой сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 25-28% В в А (А: гексаны, В: 25% ДХМ в EtOAc), с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (123 г, 73%). ЭР/МС m/z: 415 (M-H).

Подготовительный синтез 21.

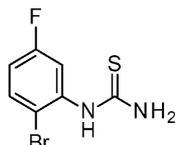
N-[(2-Бром-5-фторфенил)карбамотиоил]бензамид.



Раствор 2-бром-5-фторанилина (250 г, 1289,4 ммоль) в ТГФ (400 мл) перемешивали с помощью верхнеприводной механической мешалки. В течение 30 мин добавляли бензоилизотиоцианат (130 г, 780,6 ммоль) в ТГФ (800 мл) с помощью капельной воронки. Использовали водяную баню для поддержания внутренней температуры ниже 30°C во время добавления. Через 1,5 ч реакционную смесь выливали поровну в три 4-литровые колбы, содержащие воду (3 л). Полученные твердые вещества фильтровали под вакуумом через шоттовскую воронку. Твердые вещества промывали деионизированной водой (8 л) и сушили на воздухе под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (456 г, 99+%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 353/355 [M-H]⁻.

Подготовительный синтез 22.

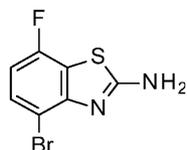
(2-Бром-5-фторфенил)тиомочевина.



К суспензии N-[(2-бром-5-фторфенил)карбамтиоил]бензамида (1600 г, 4,53 моль), ТГФ (6 л) и MeOH (1,6 л) добавляли 5 н. водный раствор NaOH (1 л). Через 18 ч перемешивания при комнатной температуре фильтровали реакционную смесь через слой диатомовой земли для удаления черных частиц. Набивку фильтра промывали смесью ТГФ/MeOH, затем 100% MeOH. Удаляли растворитель в вакууме с получением светло-коричневого твердого вещества. К полученному твердому веществу добавляли ледяную воду (4 л) и, используя верхнеприводную мешалку, добавляли 5 н. раствор HCl (~300 мл) порциями по 100 мл, чтобы довести pH смеси до 7. Добавляли дополнительное количество ледяной воды и перемешивали смесь в течение ~1 ч. Добавляли воду (4 л) и фильтровали суспензию через большую шоттовскую воронку под вакуумом. Промывали твердое вещество деионизированной водой и после удаления большей части воды промывали твердое вещество гексанами (8 л) и сушили на воздухе. Твердое вещество помещали в вакуумную печь при 50°C на 24 ч с получением указанного в заголовке соединения в виде почти белого твердого вещества (1035 г, 92%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 249/251 [M-H]⁻.

Подготовительный синтез 23.

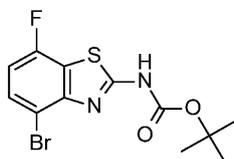
4-Бром-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин.



Серную кислоту (350 мл), охлажденную на бане со льдом/хлоридом натрия, перемешивали с помощью верхнеприводной механической мешалки. По частям добавляли (2-бром-5-фторфенил)тиомочевину (130,5 г, 523,9 ммоль) в течение 5 мин. Через десять минут внутренняя температура достигла ~1°C. В атмосфере азота 8 порциями добавляли трибромид пиридиния (185 г, 549,53 ммоль) в течение ~15 мин, поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C. Образующийся пар пропускали через ловушку с NaOH, охлаждаемую на льду. После перемешивания при ~0°C в течение 75 мин реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. Затем реакционную смесь нагревали до первоначальной внутренней температуры 50°C, затем постепенно нагревали до 59°C. Через 1,5 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Реакционную смесь выливали в большую колбу, содержащую лед. Осторожно доводили pH до ~7 с помощью 18,9 н. NaOH (620 мл). Отфильтровывали твердое вещество через шоттовскую воронку и промывали деионизированной водой до достижения pH фильтрата значения pH деионизированной воды. Полученное твердое вещество сушили на воздухе, затем помещали в вакуумную печь при ~50°C на 24 ч с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (129,3 г, 99+%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 247/249 [M+H]⁺.

Подготовительный синтез 24.

трет-Бутил-N-(4-бром-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-ил)карбамат.

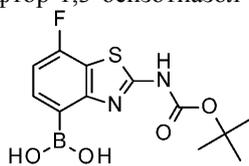


К перемешанной суспензии 4-бром-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амина (370,6 г, 1500 ммоль) и DMAP

(36,6 г, 300 ммоль) в ДХМ (1500 мл) по частям добавляли раствор ди-трет-бутилдикарбоната (388 г, 1724 ммоль), растворенного в ДХМ (150 мл), через капельную воронку с такой скоростью, чтобы контролировать выделение газа. Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 ч и затем добавляли дополнительную порцию ди-трет-бутилдикарбоната (5,0 г, 23 ммоль). Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 30 мин и затем добавляли 10% водный раствор лимонной кислоты (800 мл), и разделяли слои. Дважды экстрагировали водный слой ДХМ и один раз промывали объединенные органические экстракты насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой концентрировали в вакууме и добавляли к остатку ДХМ (200 мл) и гексаны (1800 мл). Полученную суспензию фильтровали, сушили на воздухе и сохраняли собранное твердое вещество. Концентрировали фильтрат в вакууме и добавляли к полученному остатку MeOH (500 мл) и метоксид натрия (20 мл, 5 н. в MeOH, 100 ммоль). Концентрировали смесь в вакууме при 45°C. К остатку добавляли MeOH (500 мл) и 5 н. NaOH (100 мл, 500 ммоль). Концентрировали смесь в вакууме при 45°C. К остатку добавляли воду и ДХМ и разделяли слои. Водный слой один раз экстрагировали ДХМ. Органические слои сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. К остатку добавляли 100 мл ДХМ и 900 мл гексанов, полученное твердое вещество суспендировали, фильтровали, сушили на воздухе и объединяли с первоначально полученным твердым веществом с получением указанного в заголовке соединения в идее почти белого твердого вещества (489,55 г, 94%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 290,8/292,8 [M-t-Bu+H]⁺.

Подготовительный синтез 25.

[2-(трет-Бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]бороновая кислота.



2-[(трет-Бутоксикарбонил)амино]-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-илтрифторметансульфонат (20,0 г, 48,1 ммоль), ацетат калия (14,2 г, 144 ммоль), бис(пинаколато)дифтор (97,7 г, 385 ммоль), тетра-кис(трифенилфосфин)палладий (0) (5,55 г, 4,8 ммоль) и 1,4-диоксан (240 мл) объединяли и продували азотом в течение десяти минут. Нагревали смесь при 80°C в течение ночи, затем охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой и EtOAc. Разделяли слои. Органический слой сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Добавляли ацетон (500 мл), воду (500 мл) и ацетат аммония (112 г, 1443 ммоль). Затем добавляли NaIO₄ (309 г, 1443 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру реакции от 18 до 23°C. Энергично перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. По истечении указанного времени добавляли EtOAc. Перемешивали смесь в течение 30 мин, фильтровали через диатомовую землю и разделяли слои. Концентрировали органический слой в вакууме. Разбавляли водный слой насыщенным водным раствором хлорида натрия и дважды экстрагировали EtOAc. Полученные органические экстракты объединяли с органическим слоем, концентрированным ранее. Объединенные экстракты промывали водой, насыщенным водным раствором хлорида натрия, водой и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Сушили органический слой над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Суспендировали остаток в гексанах с небольшим количеством ДХМ. Полученное твердое вещество отфильтровывали и промывали гексанами с получением указанного в заголовке соединения в идее светло-коричневого твердого вещества (13,4 г, 89%). ЭР/МС m/z: 313 (M+H).

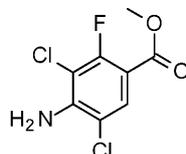
Альтернативный подготовительный синтез 25.

К суспензии гидрида натрия (60% в парафиновом масле) (34,6 г, 865 ммоль) в ТГФ (2000 мл) при внутренней температуре -17°C добавляли раствор трет-бутил-N-(4-бром-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-ил)карбамата (250,18 г, 720,6 ммоль), растворенного в ТГФ (500 мл), в течение 15 мин, поддерживая внутреннюю температуру от -10°C до -15°C в течение всего времени добавления. После добавления перемешивали смесь при температуре от -10°C до -15°C в течение 15 мин, после чего прекратилось выделение газа. Охлаждали реакционную смесь до внутренней температуры -65°C, затем через капельную воронку по каплям добавляли н-бутиллитий (350 мл, 2,5 М в гексанах, 875 ммоль) в течение 30 мин с такой скоростью, чтобы поддерживать внутреннюю температуру от -60°C до -65°C. После добавления перемешивали реакционную смесь при указанной температуре в течение 20 мин и затем по каплям добавляли триизопропилборат (416 мл, 1800 ммоль) в течение 15 мин, поддерживая внутреннюю температуру ниже -60°C. Оставляли реакционную смесь медленно нагреваться до внутренней температуры 0°C в течение 5 ч 45 мин и затем осторожно добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония (400 мл), контролируя выделение газа. К полученной смеси добавляли воду (400 мл) и EtOAc (400 мл) и разделяли слои. К водному слою добавляли достаточное количество 1 н. водного раствора HCl для доведения pH до 3-4 и затем дважды экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические экстракты сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. К остатку добавляли н-гептан (500 мл) и концентрировали смесь в вакууме при 55°C. К остатку добавляли дополни-

тельную порцию н-гептана (500 мл) и концентрировали смесь в вакууме при 55°C. К твердому остатку добавляли 200 мл ДХМ и 1800 мл гексанов и суспендировали смесь. Отфильтровывали твердое вещество, промывали гексанами и сушили на воздухе с получением указанного в заголовке соединения в виде почти белого твердого вещества (217,2 г, 94%). ЭР/МС m/z: 313 (M+H).

Подготовительный синтез 26.

Метил-4-амино-3,5-дихлор-2-фторбензоат.



Метил-4-амино-2-фторбензоат (27,0 г, 160 ммоль) и NCS (46,3 г, 336 ммоль) растворяли в ДМФА (300 мл) и нагревали при 80°C. Через 40 мин выливали реакционную смесь в ледяную воду и дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические экстракты один раз промывали 5 н. раствором NaOH, дважды 0,2 н. водным раствором LiCl, сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (37,0 г, 97%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 238/240 [M+H]⁺.

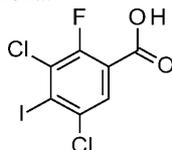
Таблица 1

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 26

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЯМР
27		4-Амино-5-хлор-2,3-дифторбензойная кислота	¹ H ЯМР (DMCO-d6) d 12,96 (с, 1H), 7,54 (дд, J= 2,1, 6,9 Гц, 1H), 6,56 (шс, 2H)
28		Метил-4-амино-5-хлор-2-фтор-3-метилбензоат	¹ H ЯМР (CDCl3) d 7,80 (д, J= 7,2 Гц, 1H), 4,56 (шс, 2H), 3,16 (с, 3H), 2,14 (д, 3H)

Подготовительный синтез 29.

3,5-Дихлор-2-фтор-4-иодбензойная кислота.

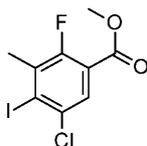


Иодид меди (I) (10,0 г, 51,5 ммоль), ACN (128 мл) и трет-бутилнитрит (13,6 мл, 103 ммоль) объединяли и нагревали смесь при 50°C в течение 30 мин, и затем к полученной смеси добавляли метил-4-амино-3,5-дихлор-2-фторбензоат (6,11 г, 25,7 ммоль). Отмечали выделение газа. Через 1 ч 40 мин при 50°C удаляли растворитель в вакууме. Добавляли воду, EtOAc и 1 н. водный раствор HCl. Дважды экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали водным раствором бисульфита натрия, сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенную смесь очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 3-5% смесью EtOAc в гексанах. Самые чистые фракции объединяли и концентрировали в вакууме с получением промежуточного метилового эфира (5,85 г, 65%).

К метил-3,5-дихлор-2-фтор-4-иодбензоату (5,85 г, 16,8 ммоль) добавляли MeOH (170 мл) и 1 н. водный раствор NaOH (17 мл). В процессе перемешивания при комнатной температуре в течение 40 мин материал полностью растворился. Удаляли MeOH в вакууме. К остатку добавляли EtOAc и 1 н. водный раствор HCl. Водный слой дважды экстрагировали EtOAc и сушили объединенные органические экстракты над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (5,56 г, 99%): ¹H ЯМР (CDCl3) δ 8,063-8,08 (д, 1H, J=6,34 Гц).

Подготовительный синтез 30.

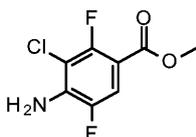
Метил-5-хлор-2-фтор-4-иод-3-метилбензоат.



Метил-4-амино-5-хлор-2-фтор-3-метилбензоат (14,8 г, 68,0 ммоль) в ACN (100 мл) добавляли к перемешиваемой смеси иодида меди (I) (15,7 г, 82,4 ммоль), ACN (100 мл) и трет-бутилнитрита (12,3 мл, 103 ммоль). Нагревали смесь в атмосфере N₂ при 40°C в течение 18 ч. Концентрировали смесь в вакууме до половины исходного объема, разбавляли EtOAc и дважды фильтровали через диатомовую землю. Собранный фильтрат концентрировали в вакууме. Неочищенную смесь очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью EtOAc в гексанах. Самые чистые фракции объединяли и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (22,46 г, 52,8%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,91 (д, J=6,6 Гц, 1H), 3,95 (с, 3H), 2,53 (д, J=3,1 Гц, 3H).

Подготовительный синтез 31.

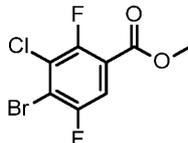
Метил-4-амино-3-хлор-2,5-дифторбензоат.



К раствору метил-4-амино-2,5-дифторбензоата (25 г, 127 ммоль) в ДМФА (100 мл) добавляли NCS (19,9 г, 146 ммоль) при комнатной температуре и затем нагревали смесь при 45°C в течение 18 ч. Выливали реакционную смесь в смесь воды (1,5 л) и диэтилового эфира (1,2 л) и разделяли слои. Экстрагировали водный слой диэтиловым эфиром (1 л). Объединенные органические экстракты промывали холодным 1 н. водным раствором NaOH, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очищали остаток флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 10-30% смесью (75% EtOAc в ДХМ)/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (24,5 г, 87%). ЭР/МС m/z: 222,2 (M+H).

Подготовительный синтез 32.

Метил-4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоат.



Метил-4-амино-3-хлор-2,5-дифторбензоат (24,5 г, 111 ммоль) в ACN (100 мл) добавляли в холодную смесь бромида меди (II) (6,2 г, 28 ммоль) и трет-бутилнитрита (20 мл, 168 ммоль) в ACN (100 мл). Нагревали полученную смесь зеленого цвета до комнатной температуры в течение 18 ч. Затем разбавляли реакционную смесь ACN, фильтровали через слой диатомовой земли и промывали ДХМ. Концентрировали фильтрат и разбавляли ДХМ, снова фильтровали через диатомовую землю и промывали ДХМ. Фильтрат промывали водой, насыщенным раствором хлорида аммония (2X), насыщенным водным раствором хлорида натрия (2X), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очищали остаток колоночной флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-50% смесью (10% EtOAc в ДХМ)/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (23,5 г, 70%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,68 (1H, м), 3,99 (3H, с).

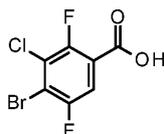
Таблица 2

Соединение, синтезированное способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 32

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЯМР
33		4-Бром-5-хлор-2,3-дифторбензойная кислота	¹ H ЯМР (DMCO-d ₆) d 7,89 (дд, J= 2,2, 6,2 Гц, 1H)

Подготовительный синтез 34.

4-Бром-3-хлор-2,5-дифторбензойная кислота.



К раствору метил-4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоата (10,8 г, 37,8 ммоль) в ТГФ (100 мл) добавляли MeOH (50 мл). Полученный однородный раствор охлаждали на ледяной бане и по каплям добавляли 2 н. раствор NaOH (60 мл, 120 ммоль). После добавления перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 30 мин. Удаляли органический растворитель в вакууме. Водный слой охлаждали на льду и доводили pH до ~2,0 с помощью 5 н. раствора HCl (24 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (3X). Объединенные органические экстракты промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток сушили в вакуумной печи при 60°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (10,3 г, 99%). ¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 7,81 (дд, J=6,0, 8,6 Гц, 1H).

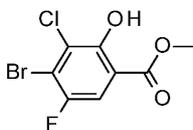
Таблица 3

Соединение, синтезированное способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 34

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЯМР
35		5-Хлор-2-фтор-4-иод-3-метилбензойная кислота	¹ H ЯМР (DMCO-d ₆) d 13,62 (с, 1H), 7,84 (д, J= 6,7 Гц, 1H), 2,45 (д, 3H).

Подготовительный синтез 36.

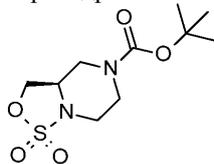
Метил-4-бром-3-хлор-5-фтор-2-гидроксibenзоат.



К раствору метил-4-бром-5-фтор-2-гидроксibenзоата (9 г, 34,3 ммоль) в уксусной кислоте (70 мл) добавляли NCS (14 г, 104,8 ммоль) и нагревали смесь до 55°C. Через 18 ч добавляли дополнительное количество NCS (5,5 г, 37,7 ммоль) и перемешивали смесь в течение 24 часов при 55°C. Затем охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры и удаляли избыток уксусной кислоты в вакууме. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 100% ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (7,1 г, 73%). ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 281/283 [M-H].

Подготовительный синтез 37.

трет-Бутил-(3aR)-1,1-диоксо-3a,4,6,7-тетрагидро-3H-оксаптиазоло[3,4-a]пиперазин-5-карбоксилат.



К суспензии имидазола (24,9 г, 362 ммоль) в ДХМ (181 мл) при 0°C по каплям добавляли тионилхлорид (8,0 мл, 110 ммоль). Перемешивали смесь при 0°C в течение 5 мин и при комнатной температуре в течение 1 ч. Охлаждали смесь до -78°C и по каплям добавляли раствор трет-бутил-(3R)-3-(гидрокси)метилпиперазин-1-карбоксилата (8,00 г, 36,2 ммоль) в ДХМ (181 мл) в течение 45 мин. Нагревали смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение 2,5 дня. Гасили реакцию насыщенным водным раствором хлорида аммония и разбавляли водой и ДХМ. Разделяли слои и снова экстрагировали водный слой ДХМ. Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением сиропообразного вещества янтарного цвета. К раствору полученного сиропообразного вещества в ацетонитриле (282 мл) при 0°C добавляли раствор периодата натрия (10,2 г, 47,6 ммоль) в воде (92 мл). Добавляли хлорид рутения (III) (76 мг, 0,37 ммоль). Перемешивали полученную суспензию при 0°C в течение 5 мин и при комнатной температуре в течение 5 ч. Гасили реакцию насыщенным водным раствором хлорида аммония и разбавляли водой и EtOAc. Разделяли слои и снова экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и фильтровали через фильтровальную бумагу, а затем через короткий слой сили-

кагеля. Концентрировали фильтрат в вакууме. К остатку добавляли ДХМ и концентрировали смесь в вакууме, и помещали под вакуум на ночь с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (9,39 г, 93%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 4,63 (1H, дд), 4,23 (1H, м), 4,23 (1H, шс), 4,07 (1H, шс), 3,64 (1H, м), 3,45 (1H, д), 3,13 (1H, м), 2,96 (2H, тд), 1,47 (9H, с).

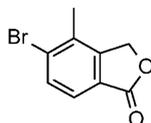
Таблица 4

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 37

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	^1H ЯМР (CDCl_3)
38		<i>tert</i> -Бутил-(3aS)-1,1-диоксо-3a,4,6,7-тетрагидро-3H-оксотиазоло[3,4-а]пирозин-5-карбоксилат	4,63 (1H, дд), 4,23 (1H, т), 4,23 (1H, шс), 4,07 (1H, шс), 3,64 (1H, м), 3,45 (1H, д), 3,13 (1H, м), 2,96 (2H, тд), 1,47 (9H, с)

Подготовительный синтез 39.

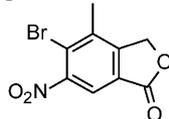
5-Бром-4-метил-3H-изобензофуран-1-он.



К суспензии (3-бром-2-метилфенил)метанола (15,0 г, 73,1 ммоль) в ТФК (75 мл) добавляли трифторацетат таллия (III) (41,8 г, 73,1 ммоль). Использовали дополнительное количество ТФК (25 мл) для смывания трифторацетата таллия (III) в реакционный сосуд. Перемешивали смесь в атмосфере азота при комнатной температуре в течение ночи и концентрировали в вакууме, и сушили под вакуумом с получением светло-коричневого твердого вещества. Полученное твердое вещество помещали в атмосферу азота и объединяли с оксидом магния (6,01 г, 149 ммоль), хлоридом лития (6,32 г, 149 ммоль) и MeOH (300 мл). Добавляли хлорид палладия (II) (1,32 г, 7,38 ммоль). Пять раз продували смесь монооксидом углерода и помещали в атмосферу монооксида углерода (под давлением из баллона). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 2 ч и добавляли хлорид палладия (II) (262 мг, 1,46 ммоль) и оксид магния (1,18 г, 29,2 ммоль). Три раза продували смесь монооксидом углерода и помещали в атмосферу монооксида углерода (под давлением из баллона). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 30 мин и добавляли хлорид палладия (II) (262 мг, 1,46 ммоль) и оксид магния (1,18 г, 29,2 ммоль). Четыре раза продували смесь монооксидом углерода и помещали в атмосферу монооксида углерода (под давлением из баллона). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1,5 ч и добавляли хлорид палладия (II) (327 мг, 1,83 ммоль) и оксид магния (1,77 г, 43,9 ммоль). Продуvalи смесь монооксидом углерода и помещали в атмосферу монооксида углерода (под давлением из баллона). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1,5 ч, фильтровали через диатомовую землю и промывали, пропуская через диатомовую землю EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-30% смесью EtOAc/гексаны. Фракции, содержащие продукт, концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (14,48 г, 70%). ЭР/МС m/z (^{79}Br / ^{81}Br) 227,0/229,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Подготовительный синтез 40.

5-Бром-4-метил-6-нитро-3H-изобензофуран-1-он.

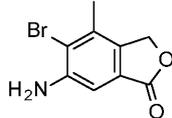


Раствор 5-бром-4-метил-3H-изобензофуран-1-она (14,4 г, 50,7 ммоль, чистота 80%) в концентрированной серной кислоте (160 мл) охлаждали до -5°C и добавляли нитрат калия (9,62 г, 95,2 ммоль). Перемешивали смесь в атмосфере азота в течение 2,5 ч и добавляли лед (750 г) при перемешивании. Полученную смесь три раза экстрагировали EtOAc. Промывали объединенные органические слои насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 10-70% смесью EtOAc/гексаны. Фракции, содержащие продукт, концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества от почти белого до желто-оранжевого цвета (11,98 г,

87%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 289,0/291,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Подготовительный синтез 41.

6-Амино-5-бром-4-метил-3Н-изобензофуран-1-он.

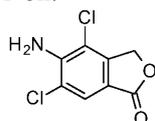


В колбу для работы под давлением добавляли 5-бром-4-метил-6-нитро-3Н-изобензофуран-1-он (11,98 г, 44,04 ммоль), ДХМ (1000 мл), ТФК (300 мл, 4 моль) и платину (5% на углеводе, сульфидированная, 3,00 г, 0,769 ммоль). Продували смесь водородом и повышали давление до 45 фунт/кв.дюйм (310 кПа) в течение 1,25 ч. Фильтровали реакционную смесь через диатомовую землю и промывали ДХМ.

Концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Сушили остаток под вакуумом и очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 10-60% смесью EtOAc/ДХМ. Фракции, содержащие продукт, концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества персикового цвета (9,86 г, 96%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 242,0/244,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Подготовительный синтез 42.

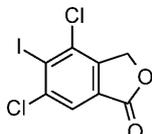
5-Амино-4,6-дихлор-3Н-изобензофуран-1-он.



К раствору 5-амино-3Н-изобензофуран-1-она (10,44 г, 68,60 ммоль) в ДМФА (100 мл) при комнатной температуре добавляли NCS (20,56 г, 150,9 ммоль). Перемешивали смесь при 50°C в течение 2,5 ч и при комнатной температуре в течение ночи. Выливали смесь в воду (1 л) и отфильтровывали осадок на фриттовом фильтре, дважды промывали водой и затем диэтиловым эфиром, и сушили посредством принудительного пропускания воздуха через фриттовый фильтр. Осадок растворяли в EtOAc, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде желтовато-оранжевого твердого вещества (14,27 г, 93%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 218,2/220,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Подготовительный синтез 43.

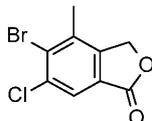
4,6-Дихлор-5-иод-3Н-изобензофуран-1-он.



К суспензии 5-амино-4,6-дихлор-3Н-изобензофуран-1-она (8,00 г, 35,6 ммоль) в ацетонитриле (237 мл) при -15°C по каплям добавляли концентрированную серную кислоту (6,5 мл, 120 ммоль). Медленно добавляли раствор нитрита натрия (4,96 г, 71,2 ммоль) в воде (36 мл). Перемешивали смесь при 0°C в течение 30 мин. По каплям добавляли раствор иодида калия (23,6 г, 142 ммоль) в воде (36 мл). Перемешивали смесь при 0°C в течение 15 мин и при комнатной температуре в течение 30 мин. Разбавляли смесь насыщенным водным раствором сульфита натрия и частично концентрировали под вакуумом для удаления большей части ацетонитрила. Разбавляли смесь EtOAc и разделяли слои. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-25% смесью EtOAc/гексаны. Фракции, содержащие продукт с примесями, концентрировали в вакууме и дополнительно очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 100% ДХМ. Чистые фракции, содержащие продукт, полученные в обеих хроматографических очистках, объединяли, концентрировали в вакууме и помещали под вакуум на ночь с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-желтого твердого вещества (6,62 г, 51%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,89 (1H, c), 5,25 (2H, c).

Подготовительный синтез 44.

5-Бром-6-хлор-4-метил-3Н-изобензофуран-1-он.

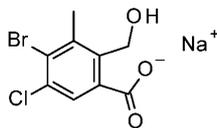


К суспензии хлорида меди (II) (5,85 г, 43,5 ммоль) в ацетонитриле (150 мл) на холодной водяной бане добавляли трет-бутилниитрит (12,9 мл, 108 ммоль) в течение 5 мин. Перемешивали смесь в течение 10 мин и убирали холодную водяную баню. Перемешивали смесь в атмосфере азота еще 25 мин. По каплям добавляли раствор 6-амино-5-бром-4-метил-3Н-изобензофуран-1-она (8,73 г, 36,1 ммоль) в ацетонитриле (550 мл) и перемешивали смесь в атмосфере азота в течение 1,5 ч. Частично концентрировали смесь в вакууме для уменьшения объема до примерно 275 мл. Разбавляли смесь насыщенным водным

раствором хлорида натрия (300 мл) и 1 М раствором HCl (500 мл) и дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои дважды промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, дважды промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 5-30% смесью EtOAc/ДХМ. Фракции, содержащие продукт, концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-желтого твердого вещества (9,03 г, 96%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 278,0/280,0 [M+H]⁺.

Подготовительный синтез 45.

4-Бром-5-хлор-2-(гидроксиметил)-3-метилбензоат натрия.



В колбу с винтовой крышкой, оснащенную мешалкой, добавляли 5-бром-6-хлор-4-метил-3H-изобензофуран-1-он (2,459 г, 8,557 ммоль) и 1 М раствор NaOH (9,4 мл, 9,4 ммоль). Закрывали колбу крышкой и нагревали при 100°C в течение 2 ч. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры и переносили в колбу объемом 1 л. Добавляли толуол (100 мл) и концентрировали смесь в вакууме, и помещали под вакуум на 3 дня с получением указанного в заголовке соединения в виде светлороманового твердого вещества (2,81 г, 99+%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 276,8/278,8 [M-H]⁻.

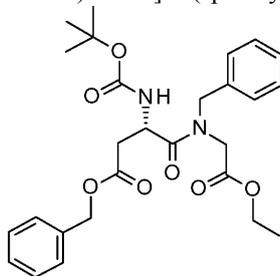
Таблица 5

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 45

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
46		3,5-Дихлор-2-(гидроксиметил)-4-иодбензоат натрия	344,8/346,8

Подготовительный синтез 47.

Бензил-(3S)-4-[бензил-(2-этокси-2-оксоэтил)амино]-3-(трет-бутоксикарбониламино)-4-оксобутаноат.

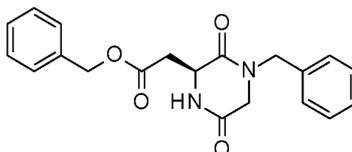


В реакционный сосуд добавляли 4-бензиловый эфир Вос-L-аспарагиновой кислоты (114 г, 352,6 ммоль). Добавляли ДХМ (950 мл) и N,N'-дициклогексилкарбодиимид (74,5 г, 361 ммоль) и охлаждали смесь до 10-20°C. По каплям добавляли этиловый эфир бензилглицина (68,2 г, 353 ммоль), поддерживая температуру ниже 20°C. Перемешивали смесь при 10-20°C в течение 17 ч, затем фильтровали и концентрировали в вакууме.

Добавляли МТБЭ (230 мл) и перемешивали смесь в течение 0,5 ч. Фильтровали смесь и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде маслянистого вещества (174,4 г, 99%).

Подготовительный синтез 48.

Бензил-2-[(2S)-4-бензил-3,6-диоксопиперазин-2-ил]ацетат.

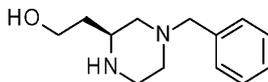


Бензил-(3S)-4-[бензил-(2-этокси-2-оксоэтил)амино]-3-(трет-бутоксикарбониламино)-4-оксобутаноат (174,4 г, 349,8 ммоль) добавляли в реакционный сосуд вместе с ДХМ (500 мл) и ТФК (230 мл). Перемешивали смесь при 15-20°C в течение 16 часов, затем концентрировали в вакууме досуха. Растворяли остаток в изопропанол (500 мл) и нагревали до 80°C в течение 1 ч. Концентрировали смесь в вакууме, затем разбавляли водой (230 мл). Нейтрализовали смесь с помощью 15% раствора NaOH в воде до pH 8-9 (использовали 109 г 15% водного раствора NaOH). Фильтровали смесь и промывали водой (2x100 мл). Сушили полученное твердое вещество под вакуумом при 50-55°C в течение 2 дней с получением указан-

ного в заголовке соединения в виде твердого вещества (95,9 г, 78%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,44 -7,29 (м, 8H), 7,32-7,23 (м, 2H), 6,91 (шс, 1H), 5,18 (д, $J=12,1$ Гц, 1H), 5,14 (д, $J=12,2$ Гц, 1H), 4,64 (д, $J=14,5$ Гц, 1H), 4,54 (д, $J=14,5$ Гц, 1H), 4,44 (шд, $J=7,9$ Гц, 1H), 3,88 (д, $J=17,7$ Гц, 1H), 3,82 (д, $J=17,7$ Гц, 1H), 3,15 (дд, $J=17,5, 3,4$ Гц, 1H), 2,93 (дд, $J=17,5, 8,3$ Гц, 1H).

Подготовительный синтез 49.

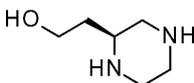
2-[(2S)-4-Бензилпиперазин-2-ил]этанол.



В реакционную емкость добавляли алюмогидрид лития (13 г, 342,5 ммоль) вместе с ТГФ (200 мл). Охлаждали смесь до $-5-0^\circ\text{C}$. Во вторую емкость добавляли бензил-2-[(2S)-4-бензил-3,6-диоксопиперазин-2-ил]ацетат (50 г, 141,9 ммоль) вместе с ТГФ (400 мл). Медленно добавляли раствор бензил-2-[(2S)-4-бензил-3,6-диоксопиперазин-2-ил]ацетата к раствору алюмогидрида лития, поддерживая температуру от -5 до 0°C . Нагревали реакционную смесь до $60-65^\circ\text{C}$ и перемешивали в течение 2 ч. Охлаждали смесь до $20-30^\circ\text{C}$ и перемешивали в течение 16 часов. Добавляли воду (13 г), затем добавляли 4% раствор NaOH в воде (52 г). Перемешивали смесь в течение 1 ч, фильтровали и концентрировали в вакууме. Добавляли изопропилацетат (200 мл) и 2 М раствор HCl (150 г). Разделяли слои и снова промывали водный слой изопропилацетатом (100 мл). Доводили водный слой до pH 11-12 с помощью NaOH и добавляли ДХМ (150 мл). Разделяли слои и промывали органический слой водой (100 мл). Разделяли слои и концентрировали органический слой в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (20,1 г, 64%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,44-7,20 (м, 5H), 3,81 (т, $J=5,2$ Гц, 2H), 3,50 (с, 2H), 3,08-2,93 (м, 2H), 2,93-2,82 (м, 1H), 2,76 (д, $J=11,5$ Гц, 2H), 2,02 (td, $J=11,1, 3,3$ Гц, 1H), 1,85 (т, $J=10,4$ Гц, 1H), 1,67-1,52 (м, 2H).

Подготовительный синтез 50.

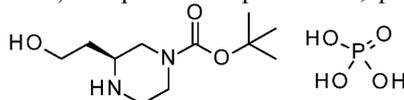
2-[(2S)-Пиперазин-2-ил]этанол.



2-[(2S)-4-Бензилпиперазин-2-ил]этанол (20 г, 91 ммоль) добавляли в реакционную емкость, продувную H_2 . Добавляли MeOH (200 мл) и добавляли $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (2 г). Продували смесь H_2 , затем повышали давление до 45 фунт/кв.дюйм (310 кПа) H_2 . Нагревали смесь до 50°C и перемешивали в течение 44 часов. Фильтровали реакционную смесь и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде маслянистого вещества (12,7 г, 99+%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3,84-3,65 (м, 2H), 3,44 (с, 1H), 2,99-2,83 (м, 4H), 2,78 (тд, $J=11,6, 2,5$ Гц, 1H), 2,68 (тд, $J=11,4, 2,8$ Гц, 1H), 2,54-2,42 (м, 1H), 1,65-1,43 (м, 2H).

Подготовительный синтез 51.

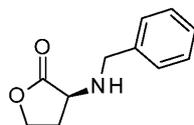
трет-Бутил-(3S)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат; фосфорная кислота.



В реакционную емкость добавляли 2-[(2S)-пиперазин-2-ил]этанол (9,2 г, 70,4 ммоль) вместе с MeOH (83 мл) и водой (9 мл). Перемешивали смесь в течение 0,5 ч при 15°C . Во вторую емкость добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (15,4 г, 70,6 ммоль) вместе с MeOH (92 мл). Добавляли раствор ди-трет-бутилдикарбоната к раствору 2-[(2S)-пиперазин-2-ил]этанола в течение 0,5 ч, поддерживая температуру ниже 15°C . Перемешивали смесь в течение 2 ч при 15°C . Объединяли фосфорную кислоту (концентрация 85%, 8,11 г, 70,4 ммоль) и EtOH в отдельной емкости и добавляли раствор фосфорной кислоты в реакционную смесь в течение 30 мин. Перемешивали полученную смесь в течение 20 мин при 15°C , затем охлаждали до -5°C в течение 3 часов. Перемешивали смесь при -5°C в течение 1 ч, фильтровали и промывали EtOH, затем сушили при 50°C в течение 4 часов с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (5,82 г, 25%). ^1H ЯМР (D_2O) δ 4,11-4,03 (м, 1H), 4,00 (шс, 1H), 3,75-3,62 (м, 2H), 3,43-3,30 (м, 2H), 3,30-3,18 (м, 1H), 3,17-2,95 (м, 2H), 1,86-1,78 (м, 2H), 1,38 (с, 9H).

Подготовительный синтез 52.

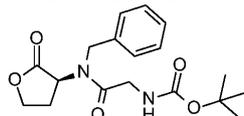
(3S)-3-(Бензиламино)тетрагидрофуран-2-он.



Суспензию гидрохлорида L-гомосеринлактона (100 г, 726,93 ммоль), порошкообразных молекулярных сит 4 \AA (178 г) и бензальдегида (57 мл, 561,3 ммоль) в ДХМ (2500 мл) перемешивали в течение ночи в атмосфере азота при 35°C . По истечении указанного времени убирали нагрев и охлаждали смесь до 20°C . В полученную смесь добавляли триацетоксиборгидрид натрия (208 г, 981,41 ммоль) и затем остав-

ляли нагреваться до комнатной температуры за 20 мин и перемешивали в течение 2 ч. По истечении указанного времени охлаждали смесь до -10°C и осторожно гасили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (400 мл). Доводили pH до 8 с помощью насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и твердого бикарбоната натрия. Фильтровали смесь через слой диатомовой земли и промывали ДХМ. Разделяли слои и еще раз экстрагировали водный слой ДХМ (1 л). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде прозрачного маслянистого вещества (87 г, 66,5%, 81 мас.%). ЭР/МС m/z: 192,2 (M+H). Для дальнейшей аналитической работы очищали образец указанного в заголовке соединения (1 г) флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 10-50% смесью EtOAc/ДХМ, с получением 422 мг очищенного соединения, указанного в заголовке. Полученный материал анализировали с помощью Chiralpak® IC, 4,6×150 мм, 10% IPA (0,2% IPAm)/CO₂, 5 мл/мин, 225 нм, обнаружен э.и. >98%.
Подготовительный синтез 53.

трет-Бутил-N-[2-[бензил-[(3S)-2-оксотетрагидрофуран-3-ил]амино]-2-оксоэтил]карбамат.



Смесь (3S)-3-(бензиламино)тетрагидрофуран-2-она (86 г, 364,27 ммоль, 81 мас.%), Вос-Gly-OH (97 г, 553,71 ммоль) и ТЭА (103 мл, 739 ммоль) в ДХМ (700 мл) охлаждали до $\sim 5^{\circ}\text{C}$. В смесь по каплям добавляли пропилфосфоновый ангидрид (50 мас.% в EtOAc) (430 мл, 737 ммоль) в течение одного часа, поддерживая внутреннюю температуру $\sim 10^{\circ}\text{C}$. После добавления оставляли смесь нагреваться до комнатной температуры. Через семь часов охлаждали смесь до 10°C и добавляли дополнительное количество Вос-Gly-OH (3,1 г, 18 ммоль), ТЭА (5 мл, 35,9 ммоль) и пропилфосфоновый ангидрид (50 мас.% в EtOAc) (22 мл, 37,7 ммоль). Нагревали смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. По истечении указанного времени охлаждали смесь до 8°C и добавляли дополнительное количество Вос-Gly-OH (9,6 г, 55 ммоль), ТЭА (10 мл, 71,7 ммоль) и пропилфосфоновый ангидрид (50 мас.% в EtOAc) (42 мл, 71,9 ммоль). Нагревали смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение ~ 7 ч. По истечении указанного времени выливали смесь на лед и осторожно гасили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (1 л). Доводили pH до 8 с помощью твердого бикарбоната натрия и разделяли слои. Водный слой еще два раза экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (500 мл). Органический слой фильтровали через слой диатомовой земли и сульфата натрия. Концентрировали органический слой в вакууме до объема 1 л и дважды промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушили органический слой над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения, которое использовали без дополнительной очистки (194 г, 53,5%, 35 мас.%). ЭР/МС m/z: 249,0 (M-t-Bu+H).

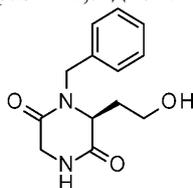
Таблица 6

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 53

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
54		трет-Бутил-N-[(1S)-2-[бензил-[(3S)-2-оксотетрагидрофуран-3-ил]амино]-1-метил-2-оксоэтил]карбамат	263,0
55		трет-Бутил-N-[(1R)-2-[бензил-[(3S)-2-оксотетрагидрофуран-3-ил]амино]-1-метил-2-оксоэтил]карбамат	263,0

Подготовительный синтез 56.

(6S)-1-Бензил-6-(2-гидроксиэтил)пиперазин-2,5-дион.



ТФК (100 мл, 1310 ммоль) добавляли в смесь трет-бутил-N-[2-[бензил-[(3S)-2-оксотetraгидрофуран-3-ил]амино]-2-оксоэтил]карбамата (194 г, 194,9 ммоль, 35 мас.%) в ДХМ (500 мл). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. По истечении указанного времени добавляли дополнительное количество ТФК (50 мл, 653 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре. Через два часа добавляли дополнительное количество ТФК (50 мл, 653 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. По истечении указанного времени концентрировали смесь в вакууме. Полученный остаток разбавляли водой (600 мл) и дважды промывали диэтиловым эфиром. Доводили pH до 7 с помощью 1 н. водного раствора NaOH и затем доводили до pH 12 с помощью 5 н. водного раствора NaOH. Добавляли MeOH (~10 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре. В смесь добавляли дополнительное количество 5 н. водного раствора NaOH с интервалами по пять минут для доведения pH до 12. Перемешивали смесь при pH 12, в целом, в течение 35 мин. По истечении указанного времени доводили pH до 8 с помощью 10% водного раствора HCl и экстрагировали ДХМ (5×1 л). Затем доводили pH водного слоя до 5 с помощью 10% водного раствора HCl и снова экстрагировали ДХМ (1 л). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (17 г, 33,4%). Осуществляли дополнительную экстракцию водного слоя, поочередно используя 25% IPA/хлороформ и ДХМ, до удаления указанного в заголовке продукта из водного слоя, по данным ЖХ/МС. В объединенные органические слои добавляли (150 мл). Дважды промывали органические слои насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением дополнительного количества соединения, указанного в заголовке (17,2 г, 35,5%), с общим выходом 34,2 г (68,9%). ЭР/МС m/z: 249,0 (M+H).

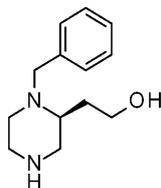
Таблица 7

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 56

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
57		(3S,6S)-1-бензил-6-(2-гидроксиэтил)-3-метилпиперазин-2,5-дион	263,0
58		(3R,6S)-1-бензил-6-(2-гидроксиэтил)-3-метилпиперазин-2,5-дион	263,0

Подготовительный синтез 59.

2-[(2S)-1-Бензилпиперазин-2-ил]этанол.

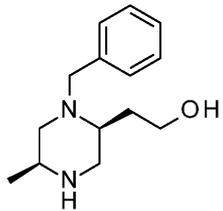
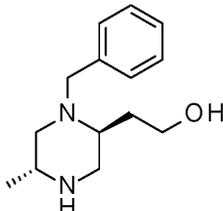


К нагретому до 45°C раствору 2 М алюмогидрида лития в ТГФ (131 мл, 262 ммоль) по каплям добавляли раствор (6S)-1-бензил-6-(2-гидроксиэтил)пиперазин-2,5-диона (34 г, 131,5 ммоль) в ТГФ (200 мл). После добавления нагревали смесь до 60°C. Через ~3,5 ч добавляли дополнительное количество 2 М раствора

алюмогидрида лития в ТГФ (33 мл, 66 ммоль) и перемешивали смесь при 60°C. Через час добавляли дополнительное количество 2 М раствора алюмогидрида лития в ТГФ (131 мл, 262 ммоль) и перемешивали смесь при 60°C в течение ночи. По истечении указанного времени добавляли 2 М раствор алюмогидрида лития в ТГФ (6 мл, 12 ммоль) и перемешивали смесь при 60°C. Через четыре часа добавляли 2 М раствор алюмогидрида лития в ТГФ (6 мл, 12 ммоль) и перемешивали смесь в течение двух часов при 60°C. Убирали нагрев и охлаждали смесь до 10°C. По каплям добавляли воду (16 мл), затем по каплям добавляли 3,75 М водный раствор NaOH (16 мл), затем ТГФ (300 мл). Добавляли воду (48 мл) и перемешивали полученную смесь в течение ночи при комнатной температуре. По истечении указанного времени фильтровали смесь через слой диатомовой земли и промывали EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (28,8 г, 67,6%, 68 мас.%). ЭР/МС m/z: 221,0 (M+H).

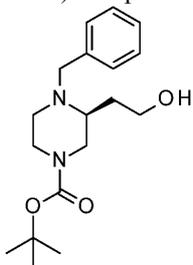
Таблица 8

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 59

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
60		2-[(2S,5S)-1-Бензил-5-метилпиперазин-2-ил]этанол	235,0
61		2-[(2S,5R)-1-Бензил-5-метилпиперазин-2-ил]этанол	235,0

Подготовительный синтез 62.

трет-Бутил-(3S)-4-бензил-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат.



Раствор бикарбоната натрия (80 г, 952 ммоль) в воде (500 мл) добавляли в раствор 2-[(2S)-1-бензилпиперазин-2-ил]этанола (28 г, 86,43 ммоль) в 1,4-диоксане (500 мл) при комнатной температуре. Добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (26,6 г, 122 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 20 мин. По истечении указанного времени добавляли лед (400 мл), воду (200 мл) и EtOAc (1 л) и разделяли слои. Водный слой еще раз экстрагировали EtOAc (1 л). Объединенные органические слои промывали водой (250 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (250 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученное маслянистое вещество очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 10-70% смесью EtOAc/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения (20,79 г, 74%). ЭР/МС m/z: 321,2 (M+H). Полученный материал анализировали с помощью Chiralpak® IC, 4,6×150 мм, 15% IPA (0,2% IPAm)/CO₂, 5 мл/мин, 225 нм, обнаружен э.и. 96%.

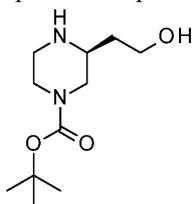
Таблица 9

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 62

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
63		<i>tert</i> -Бутил-(2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-4-бензил-5-(2-гидроксиэтил)-2-метилпиперазин-1-карбоксилат	335,0
64		<i>tert</i> -Бутил-(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-4-бензил-5-(2-гидроксиэтил)-2-метилпиперазин-1-карбоксилат	335,0

Подготовительный синтез 65.

tert-Бутил-(3*S*)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат.



20% Pd(OH)₂ на углеводе (24,39 г, 176,4 ммоль) добавляли в емкость, продуваемую азотом. В емкость добавляли EtOH (620 мл), затем *tert*-бутил-(3*S*)-4-бензил-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат (61,93 г, 193,3 ммоль) и EtOH (620 мл). Закрывали емкость, продували азотом и повышали давление водорода (60 фунт/кв.дюйм (414 кПа)). Устанавливали емкость на встряхиватель Парра на 15 ч при комнатной температуре. По истечении указанного времени фильтровали реакционную смесь и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (42,74 г, 98%). ЭР/МС m/z 231,0: (M+H).

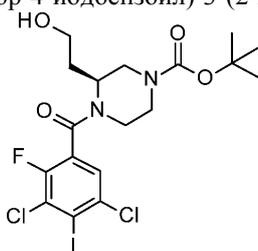
Таблица 10

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 65

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
66		<i>tert</i> -Бутил-(2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(2-гидроксиэтил)-2-метилпиперазин-1-карбоксилат	245,0
67		<i>tert</i> -Бутил-(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-(2-гидроксиэтил)-2-метилпиперазин-1-карбоксилат	245,0

Подготовительный синтез 68.

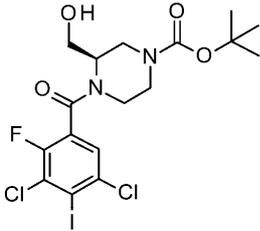
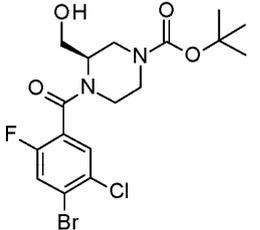
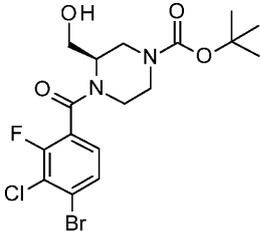
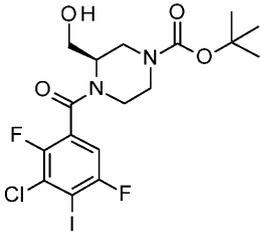
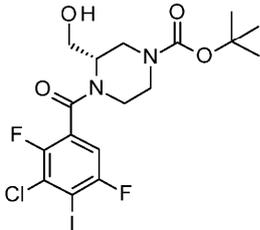
трет-Бутил-(3S)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-иодбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-карбоксилат.

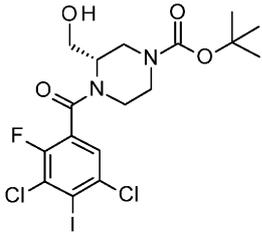
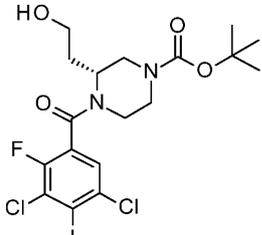
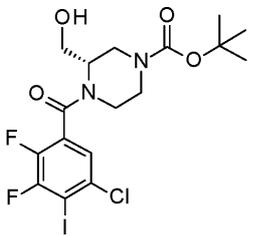
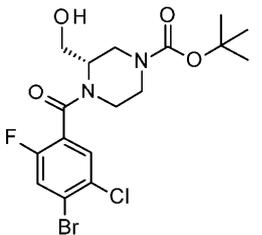
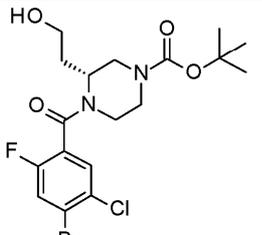
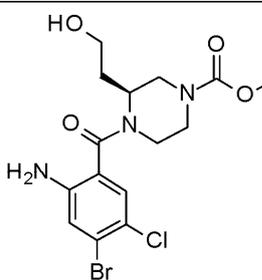


3,5-Дихлор-2-фтор-4-иодбензойную кислоту (0,80 г, 2,4 ммоль) добавляли к DIEA (2 мл, 11,5 ммоль) в ТГФ (22 мл), затем добавляли НАТУ (0,84 г, 2,2 ммоль) и перемешивали в течение 1 ч. Затем добавляли трет-бутил-(3S)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат (0,50 г, 2,2 ммоль) и кипятили реакционную смесь с обратным холодильником в течение ночи. По истечении указанного времени добавляли 5 н. раствор NaOH и перемешивали реакционную смесь в течение 1 ч. Добавляли EtOAc и воду. Водный слой два раза экстрагировали EtOAc. Объединенные органические экстракты сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенную смесь очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью EtOAc:гексан (30:70), с получением указанного в заголовке соединения (0,858 г, 72%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 491/493 $[\text{M-t-Bu+H}]^+$.

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 68

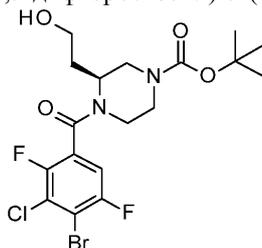
Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
69		<i>tert</i> -Бутил-(3S)-4-(4-бром-5-хлор-2,3-дифторбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат	427,0/429,0
70		<i>tert</i> -Бутил-(3S)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат	408,8/410,8
71		<i>tert</i> -Бутил-(3S)-4-(4-бром-3-хлор-2-фторбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат	408,9/411,0
72		<i>tert</i> -Бутил-(3R)-4-(5-хлор-2-фтор-4-иод-5-метилбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	457,0/459,2
73		<i>tert</i> -Бутил-(3R)-4-(5-хлор-2,3-дифтор-4-иодбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	461,0/463,0

74		<i>трет</i> -Бутил-(3R)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-иодбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	476,8/478,8
75		<i>трет</i> -Бутил-(3R)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	394,8/396,8
76		<i>трет</i> -Бутил-(3R)-4-(4-бром-3-хлор-2-фторбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	394,8/396,8
77		<i>трет</i> -Бутил-(3R)-4-(3-хлор-2,5-дифтор-4-иодбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	461,0/463,0
78		<i>трет</i> -Бутил-(3S)-4-(3-хлор-2,5-дифтор-4-иодбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	461,2/463,0

79		<i>трет</i> -Бутил-(3S)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-иодбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	477,0/478,9
80		<i>трет</i> -Бутил-(3R)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-иодбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат	490,9/492,8
81		<i>трет</i> -Бутил-(3S)-4-(5-хлор-2,3-дифтор-4-иодбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	461,0/463,0
82		<i>трет</i> -Бутил-(3S)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	394,8/396,8
83		<i>трет</i> -Бутил-(3R)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат	408,8/410,8
84		<i>трет</i> -Бутил-(3S)-4-(2-амино-4-бром-5-хлорбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат	406,0/408,0

Подготовительный синтез 85.

трет-Бутил-(3 S)-4-(4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат.



Раствор 4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензойной кислоты (10,2 г, 37,6 ммоль) и 4-метилморфолина (7,50 мл, 68,0 ммоль) в ТГФ (200 мл) охлаждали до 0°C на ледяной бане и обрабатывали 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазином (9,10 г, 50,8 ммоль). Перемешивали смесь на ледяной бане в течение 30 мин и затем по каплям добавляли трет-бутил-(3S)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат (0,93 М в ТГФ, 40,0 мл, 37,2 ммоль) через капельную воронку. Через 1 ч при 0°C добавляли 5 н. раствор NaOH (35,0 мл, 180 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Разбавляли смесь EtOAc, обрабатывали насыщенным раствором бикарбоната натрия и перемешивали в течение 15 мин. Отделяли органическую фазу, промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-90% смесью (20% ацетона в ДХМ)/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (16,0 г, 88%). ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 427/429 [M-t-Bu+H]⁺.

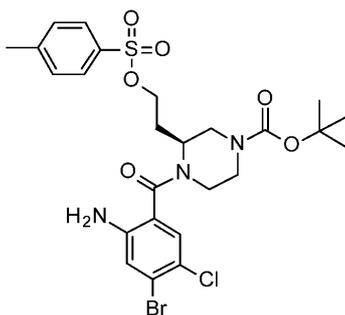
Таблица 12

Соединение, синтезированное способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 85

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
86		трет-Бутил-(3R)-4-(4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоил)-3-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат	412,8/414,8

Подготовительный синтез 87.

трет-Бутил-(3S)-4-(2-амино-4-бром-5-хлорбензоил)-3-[2-(п-толилсульфонилокси)этил]пиперазин-1-карбоксилат.

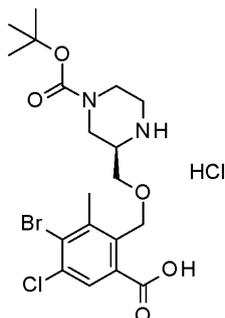


К охлажденному до 0°C раствору трет-бутил-(3S)-4-(2-амино-4-бром-5-хлорбензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилата (1 г, 2,16 ммоль) и ТЭА (1 мл, 7,14 ммоль) в ДХМ (25 мл) добавляли DMAP (45 мг, 0,36 ммоль) и п-толуолсульфонилхлорид (469 мг, 2,39 ммоль). Перемешивали реакционную смесь при 0°C в течение 15 мин, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры. Через 3 часа добавляли дополнительное количество п-толуолсульфонилхлорида (122 мг, 0,62 ммоль). Через 1 ч разбавляли реакционную смесь ДХМ и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле с получением указанного в заголовке соединения (473 мг, 35%). ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 616,0/618,0 [M+H]⁺.

Подготовительный синтез 88.

Гидрохлорид 4-бром-2-[[[(2R)-4-трет-бутоксикарбонилпиперазин-2-ил]метоксиметил]-5-хлор-3-

метилбензойной кислоты.



К 4-бром-5-хлор-2-(гидроксиметил)-3-метилбензоату натрия (2,05 г, 6,39 ммоль) в колбе объемом 250 мл добавляли толуол (50 мл) и концентрировали смесь в вакууме. Растворяли остаток в ДМФА (21 мл) и ТГФ (11 мл) и охлаждали до 0°C. Добавляли гидрид натрия (60 мас.% в парафиновом масле) (511 мг, 12,8 ммоль). После добавления перемешивали смесь при 0°C в течение 10 мин. Во второй колбе к трет-бутил-(3*R*)-1,1-диоксо-3*a*,4,6,7-тетрагидро-3*H*-оксаиазоло[3,4-*a*]пирозин-5-карбоксилату (1,96 г, 7,04 ммоль) добавляли толуол (20 мл) и концентрировали смесь в вакууме. Растворяли остаток в ТГФ (11 мл) и по каплям добавляли к содержимому первой колбы при 0°C. Нагревали смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение 1,5 ч. Медленно добавляли 5 М раствор HCl (7 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 5 мин и затем гасили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Понижали pH до pH 2, медленно добавляя 5 М раствор HCl, и разбавляли смесь EtOAc. Разделяли слои и три раза экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Растворяли остаток в ТГФ (40 мл) и добавляли 5 М раствор HCl (6 мл). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 20 мин. Разбавляли смесь насыщенным водным раствором хлорида натрия и EtOAc и разделяли слои. Сушили органический слой над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме, и помещали под вакуум на 2 ч с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (4,27 г, 73%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 477,2/479,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

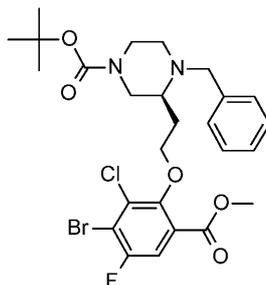
Таблица 13

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 88

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
89	HCl	Гидрохлорид 2-[[2-(<i>2R</i>)-4- <i>tert</i> -бутоксикарбонилпиперазин-2-ил]метоксиметил]-3,5-дихлор-4-иодбензойной кислоты	545,2/547,2
90	HCl	Гидрохлорид 2-[[2-(<i>2S</i>)-4- <i>tert</i> -бутоксикарбонилпиперазин-2-ил]метоксиметил]-3,5-дихлор-4-иодбензойной кислоты	545,0/547,2

Подготовительный синтез 91.

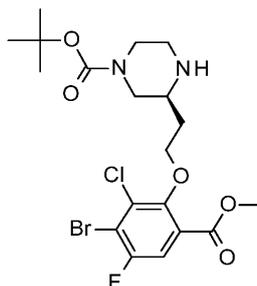
трет-Бутил-(3S)-4-бензил-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонилфенокси)этил]пиперазин-1-карбоксилат.



Раствор метил-4-бром-3-хлор-5-фтор-2-гидроксibenzoата (3,0 г, 11,0 ммоль), трифенилфосфина (4,19 г, 16,0 ммоль) и трет-бутил-(3S)-4-бензил-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилата (12 мл, 1,039 М в ТГФ) в ТГФ (~50 мл) охлаждали до 0°C в течение 10 мин. По каплям добавляли диизопропилазодикарбоксилат (3,1 мл, 16 ммоль) и оставляли смесь нагреваться до комнатной температуры. После расходования исходного спирта добавляли лед и разбавляли реакционную смесь EtOAc. Дважды промывали смесь насыщенным водным раствором хлорида натрия и сушили органический слой над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме до маслянистого вещества янтарного цвета. Очищали остаток колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя 0-10% смесью EtOAc/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения (6,2 г, 99+%). Аналитический образец с чистотой ~95% получали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя 25-50% смесью (1:1 EtOAc:ДХМ)/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного маслянистого вещества. ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 585/587 [M+H]⁺.

Подготовительный синтез 92.

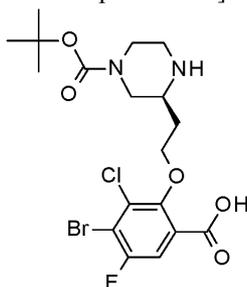
трет-Бутил-(3S)-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонилфенокси)этил]пиперазин-1-карбоксилат.



К раствору трет-бутил-(3S)-4-бензил-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонилфенокси)этил]пиперазин-1-карбоксилата (7,0 г, 11,35 ммоль) в ДХМ (75 мл) добавляли N,N-диизопропиламин (5,94 мл, 34,1 ммоль). Охлаждали раствор на ледяной бане и по каплям добавляли 1-хлорэтилхлорформиат (3,7 мл, 34 ммоль). После добавления убирали ледяную баню и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 18 ч. По каплям добавляли дополнительное количество 1-хлорэтилхлорформиата (2 мл, 17 ммоль) и N,N-диизопропиламина (3 мл, 17 ммоль) при комнатной температуре и через 7 ч добавляли дополнительное количество 1-хлорэтилхлорформиата (0,60 мл, 5,67 ммоль) и N,N-диизопропиламина (1 мл, 5,67 ммоль) для взаимодействия с оставшимся исходным материалом. Концентрировали реакционную смесь в вакууме. К остатку добавляли толуол и концентрировали смесь (повторяли 2X). Полученное полутвердое вещество разбавляли MeOH (100 мл) и перемешивали при комнатной температуре до завершения образования продукта. Удаляли растворитель в вакууме с получением остатка янтарного цвета. Очищали остаток колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя 0-10% смесью MeOH/ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (5,11 г, 91%). ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 495/497 [M+H]⁺.

Подготовительный синтез 93.

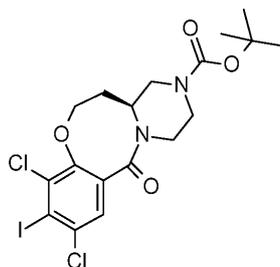
4-Бром-2-[2-[(2S)-4-трет-бутоксикарбонилпиперазин-2-ил]этокси]-3-хлор-5-фтор-бензойная кислота.



Раствор трет-Бутил-(3S)-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонилфенокси)этил]пиперазин-1-карбоксилата (5 г, 10,08 ммоль) в ТГФ (100 мл) и MeOH (12 мл) охлаждали на ледяной бане. Добавляли водный раствор гидроксида лития (6,5 мл, 6,25 М) и деионизированную воду (10 мл). Убирали ледяную баню и перемешивали смесь при комнатной температуре. Через 3 часа в реакционную смесь добавляли лед и доводили pH до 5-6 с помощью 10% лимонной кислоты (12 мл). Добавляли насыщенный водный раствор хлорида натрия (100 мл) и разбавляли смесь EtOAc (400 мл), и разделяли слои. Водный слой снова экстрагировали EtOAc (300 мл) и сушили объединенные органические экстракты над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (4,83 г, 98%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 481/483 [M+H]⁺.

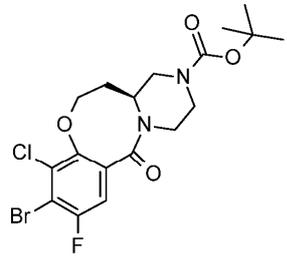
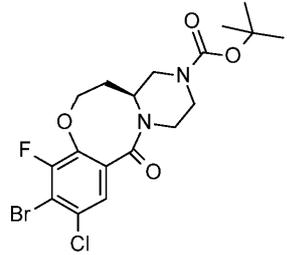
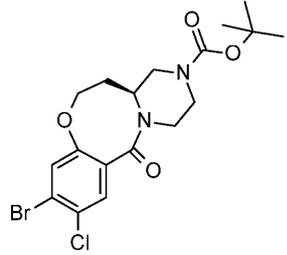
Подготовительный синтез 94.

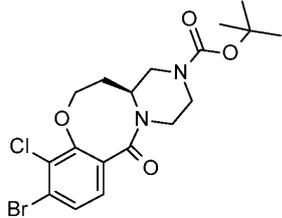
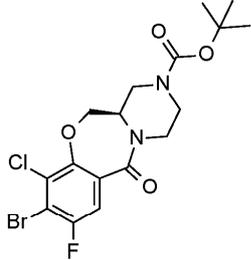
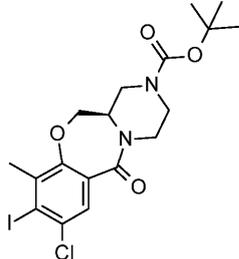
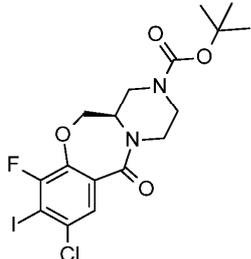
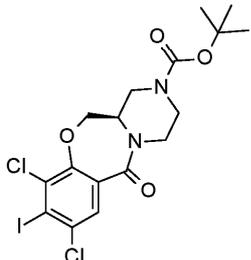
трет-Бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-иод-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиперазино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-2-карбоксилат.

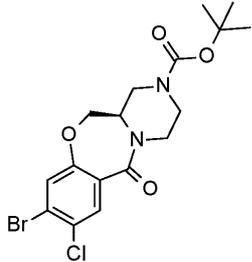
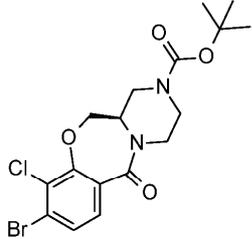
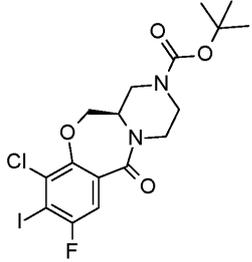
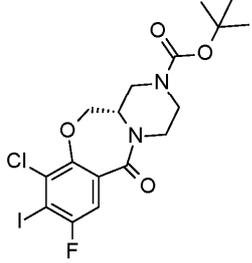
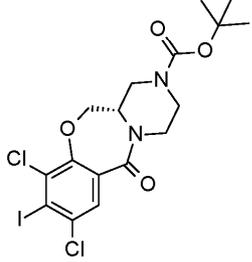


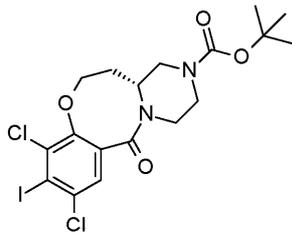
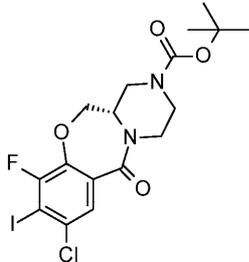
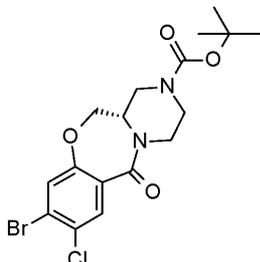
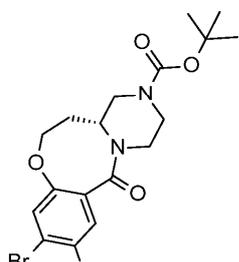
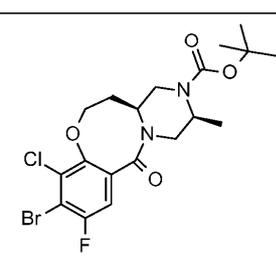
трет-Бутил-(3 S)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-иод-бензоил)-3-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилат (4,438 г, 8,110 ммоль) в ДФА (100 мл) охлаждали до 0°C и затем к полученному раствору добавляли твердый гидрид натрия (60 мас.% в парафиновом масле) (0,81 г, 20 ммоль). Через 1 ч при 0°C гасили реакционную смесь насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Добавляли воду и EtOAc. Два раза экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические экстракты дважды промывали 0,2 М водным раствором хлорида лития, сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 30-50% смесью EtOAc/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (3,394 г, 79%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 471/473 [M-t-Bu+H]⁺.

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 94

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
95		<i>tert</i> -Бутил-(13аS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	407,0/409,0
96		<i>tert</i> -Бутил-(13аS)-9-бром-8-хлор-10-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	406,9/409,0
97		<i>tert</i> -Бутил-(13аS)-9-бром-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	388,8/390,8

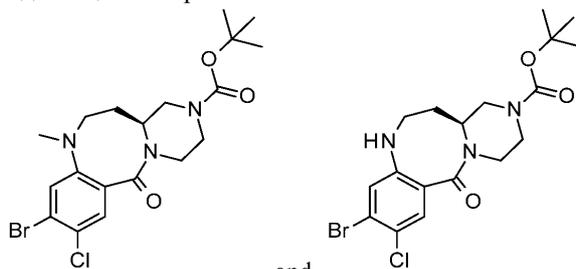
98		<i>tert</i> -Бутил-(13aS)-9-бром-10-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1- <i>d</i>][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	389,0/391,0
99		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-бром-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1- <i>c</i>][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	393,0/395,0
100		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-7-хлор-8-иод-7-метил-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1- <i>c</i>][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	9437,0
101		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-9-хлор-7-фтор-8-иод-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1- <i>c</i>][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	441,0/443,0
102		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-7,9-дихлор-8-иод-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1- <i>c</i>][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	456,8/458,8

103		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-бром-9-хлор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	374,8/376,8
104		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-бром-7-хлор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	374,8/376,8
105		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-7-хлор-9-фтор-8-иод-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	441,0/443,0
106		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-7-хлор-9-фтор-8-иод-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	441,0/443,0
107		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-7,9-дихлор-8-иод-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	456,9/458,9

108		<i>tert</i> -Бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-иод-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	470,8/472,8
109		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-9-хлор-7-фтор-8-иод-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	441,0/443,0
110		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-8-бром-9-хлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	374,8/376,8
111		<i>tert</i> -Бутил-(13aR)-9-бром-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	388,8/390,8
112		<i>tert</i> -Бутил-(3S,13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	421,0/423,0

Подготовительный синтез 113.

tert-Бутил-(13aS)-9-бром-8-хлор-11-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензодиазоцин-2-карбоксилат и *tert*-бутил-(13aS)-9-бром-8-хлор-6-оксо-3,4,11,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензодиазоцин-2-карбоксилат.

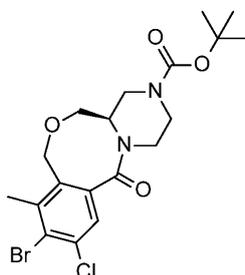


tert-Бутил-(3S)-4-(2-амино-4-бром-5-хлорбензоил)-3-[2-(*p*-толилсульфилокси)этил]пиперазин-1-

карбоксилат (473 мг, 0,767 ммоль) в ДМФА (15 мл) охлаждали до 0°C и затем к полученному раствору добавляли твердый гидрид натрия (60 мас.% в парафиновом масле) (49 мг, 1,225 ммоль). Перемешивали реакционную смесь при 0°C в течение 2 ч, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали еще 2 ч. По истечении указанного времени охлаждали реакционную смесь до -78°C и добавляли метилиодид (50 мкл, 0,803 ммоль). Через 30 мин нагревали реакционную смесь до 0°C и перемешивали в течение 18 ч, и нагревали до комнатной температуры. Снова охлаждали смесь до 0°C и добавляли дополнительное количество метилиодида (50 мкл, 0,803 ммоль). Через 1 ч наблюдали отсутствие дальнейшего метилирования, нагревали реакционную смесь до комнатной температуры и добавляли триэтиламин (100 мкл, 0,717 ммоль). Еще через 1 ч гасили реакционную смесь водой, разбавляли насыщенным водным раствором NH₄Cl и EtOAc. Разделяли слои и еще два раза экстрагировали водный слой EtOAc. Промывали объединенные органические слои насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Полученное твердое вещество растирали с ACN и сушили под вакуумом без какой-либо дополнительной очистки с получением смеси указанных в заголовке соединений (3:2 NH к NMe, 345 мг, 99+%). ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 444,0/446,0 [M+H]⁺ и 458,0/460,0 [M+H]⁺.

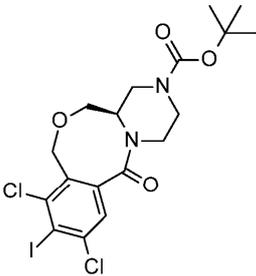
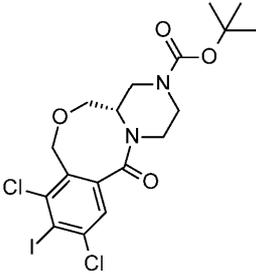
Подготовительный синтез 114.

трет-Бутил-(13aR)-9-бром-8-хлор-10-метил-6-оксо-1,3,4,11,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазацин-2-карбоксилат.



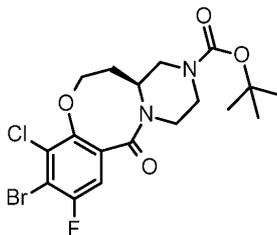
Раствор гидрохлорида 4-бром-2-[[2R]-4-трет-бутоксикарбонилпиперазин-2-ил]метоксиметил]-5-хлор-3-метилбензойной кислоты (500 мг, 0,749 ммоль) и DIEA (0,39 мл, 2,2 ммоль) в ДМФА (3,7 мл) по каплям добавляли к раствору НАТУ (581 мг, 1,50 ммоль) в ДМФА (3,7 мл) при 0°C. Перемешивали смесь при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 30 мин. В отдельной колбе раствор гидрохлорида 4-бром-2-[[2R]-4-трет-бутоксикарбонилпиперазин-2-ил]метоксиметил]-5-хлор-3-метилбензойной кислоты (2,62 г, 3,92 ммоль, чистота 77%) и DIEA (2,1 мл, 12 ммоль) в ДМФА (20 мл) по каплям добавляли к раствору НАТУ (3,04 г, 7,84 ммоль) в ДМФА (20 мл) при 0°C. Перемешивали смесь при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 30 мин. Объединяли две реакционные смеси, разбавляли EtOAc и промывали 0,5 М HCl, водой, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушили органический слой над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очищали неочищенный материал флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-65% смесью EtOAc/гексаны. Чистые фракции концентрировали в вакууме. К остатку добавляли ДХМ и концентрировали смесь в вакууме, и помещали под вакуум на 3 часа с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (1,95 г, 86%). ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 459/461 [M+H]⁺.

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 114

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
115		<i>tert</i> -Бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-иод-6-оксо-1,3,4,11,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	527,2/529,0
116		<i>tert</i> -Бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-иод-6-оксо-1,3,4,11,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	471,0/473,0

Подготовительный синтез 117.

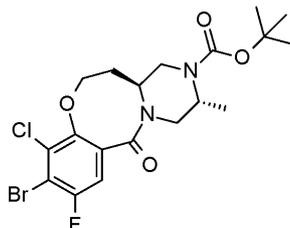
tert-Бутил-(13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат.



К раствору 4-бром-2-[2-[(2S)-4-*tert*-бутоксикарбонилпиперазин-2-ил]этокси]-3-хлор-5-фторбензойной кислоты (4,8 г, 10 ммоль) в ДХМ (50 мл), охлажденному на ледяной бане, добавляли ТЭА (2,8 мл, 20 ммоль). По каплям добавляли пропилфосфоновый ангидрид (11 мл, 18,8 ммоль, 50 мас.% в EtOAc). После добавления перемешивали смесь в течение 10 мин. Добавляли ДХМ (250 мл) и насыщенный раствор хлорида аммония (100 мл). Удаляли водный слой и экстрагировали ДХМ (100 мл), и промывали объединенные органические слои насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл), сушили над сульфатом натрия и фильтровали. Обрабатывали фильтрат активированным древесным углем (3,5 г) и перемешивали в течение 10 мин. Фильтровали смесь через слой диатомовой земли и концентрировали в вакууме до маслянистого вещества. Добавляли хлороформ и концентрировали в вакууме (повторяли 2X) с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (4,64 г, 99%). ЭР/МС m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 407/409 [M-t-Bu+H]⁺.

Подготовительный синтез 118.

tert-Бутил-(3R,13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат.

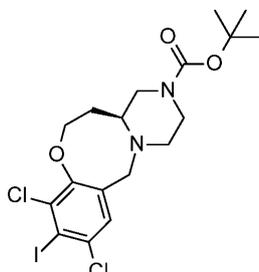


Раствор метил-4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоата (1,00 г, 3,50 ммоль) и *tert*-бутил-(2R,5S)-5-(2-гидроксиэтил)-2-метилпиперазин-1-карбоксилата (1,07 г, 4,38 ммоль) в ДМФА (17,5 мл) охлаждали на ледяной бане. Добавляли карбонат цезия (2,31 г, 7,01 ммоль). Реакционную смесь оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры в течение ночи. Через 18 ч нагревали реакционную смесь до 80°C в течение 24 часов. После охлаждения до комнатной температуры добавляли полунасыщенный водный

раствор хлорида натрия (50 мл) и разбавляли смесь EtOAc (100 мл), и разделяли слои. Водный слой еще два раза экстрагировали EtOAc (50 мл), и объединенные органические слои промывали водой (2×50 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл) и затем сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-100% смесью МТБЭ/гексан, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (690 мг, 41%). ЭР/МС m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 476,0/478,0 [M+H]⁺.

Подготовительный синтез 119.

трет-Бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-иод-3,4,6,12,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат.

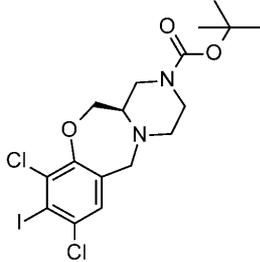
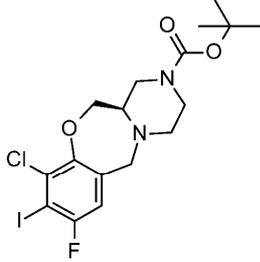
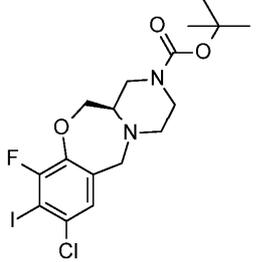
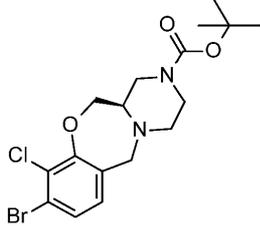
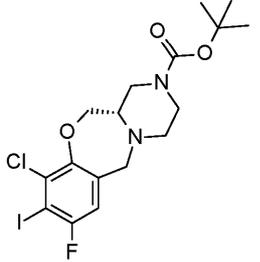


1 М раствор комплекса борана с диметилсульфидом в ТГФ (2 мл, 2 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси трет-бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-иод-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилата (1,0 г, 1,9 ммоль) в ТГФ (20 мл) и нагревали до кипения с обратным холодильником в течение 18 ч. По истечении указанного времени в смесь добавляли дополнительное количество 1 М раствора комплекса борана с диметилсульфидом в ТГФ (2 мл, 2 ммоль) и перемешивали при кипении с обратным холодильником еще 5 ч. Охлаждали смесь до комнатной температуры, осторожно гасили MeOH и концентрировали в вакууме. Очищали остаток колоночной флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 30-70% смесью EtOAc/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (900 мг, 90%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 512,8/514,8 [M+H]⁺.

Таблица 16

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 119

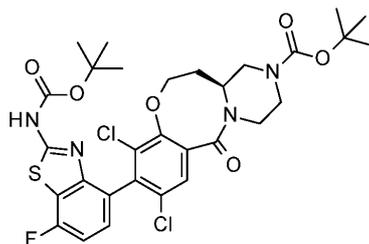
Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
120		трет-Бутил-(13aS)-9-бром-8-хлор-3,4,6,12,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	430,9/433,0

121		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-7,9-дихлор-8-иод-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	498,8/500,8
122		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-7-хлор-9-фтор-8-иод-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	483,2/485,2
123		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-9-хлор-7-фтор-8-иод-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	483,0/485,0
124		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-бром-7-хлор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	417,0/419,0
125		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-7-хлор-9-фтор-8-иод-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	483,2/485,2

126		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-7,9-дихлор-8-иод-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	499,0/501,0
127		<i>tert</i> -Бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-иод-3,4,6,12,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	512,9/514,8
128		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-9-хлор-7-фтор-8-иод-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	483,0/485,0
129		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-8-бром-9-хлор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	416,8/419,0
130		<i>tert</i> -Бутил-(13aR)-9-бром-8-хлор-10-метил-3,4,6,11,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	445,2/447,2
131		<i>tert</i> -Бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-иод-3,4,6,11,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	513,2/515,2

Подготовительный синтез 132.

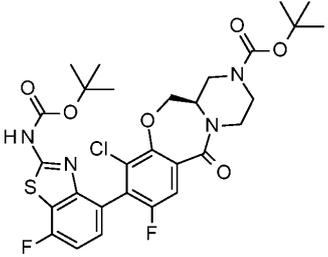
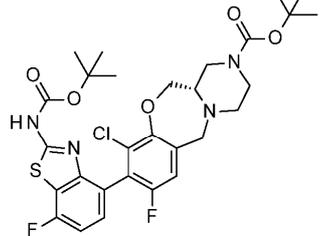
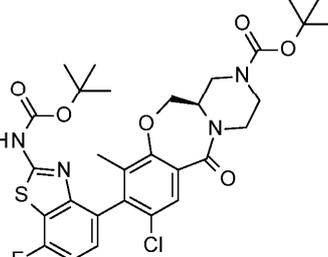
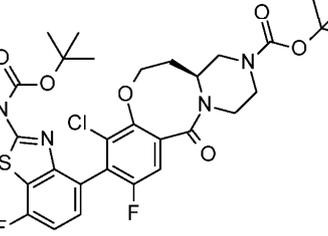
tert-Бутил-(13aS)-9-[2-(*tert*-бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8,10-дихлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат.



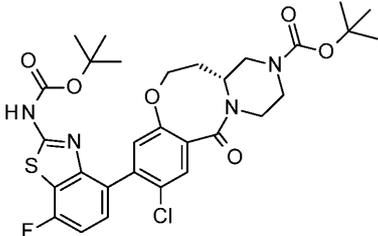
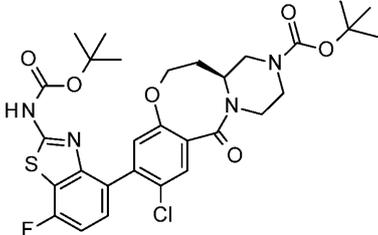
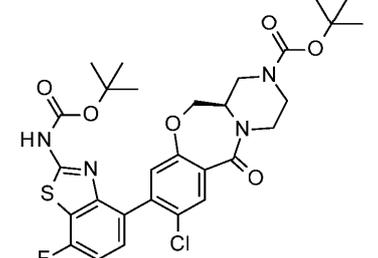
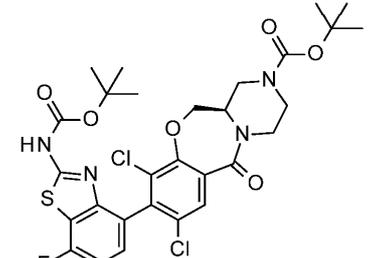
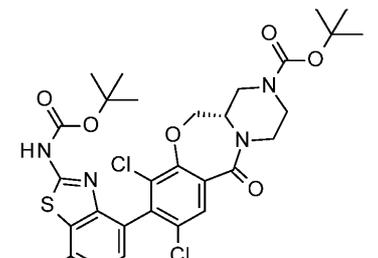
В пробирку, закрываемую винтовой крышкой, оснащенную мешалкой, добавляли трет-бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-иод-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиридино[2,1-d][1,5]бензоксаоцин-2-карбоксилат (750 мг, 1,423 ммоль), [2-(трет-бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]бороновую кислоту (650 мг, 2,083 ммоль), трехосновный фосфат калия (450 мг, 2,12 ммоль) и дихлорид 1,1'-бис(ди-трет-бутилфосфино)ферроценпалладия (100 мг, 0,15 ммоль). Добавляли заранее смешанный и дегазированный 1,4-диоксан (15 мл) и воду (5 мл) и продували полученную смесь азотом в течение 20 мин. Закрывали пробирку и нагревали при 80°C в течение 1 ч. Затем выливали содержимое реакционной смеси в воду, насыщенный водный раствор хлорида натрия и EtOAc. Разделяли слои и один раз экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические экстракты сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 30-70% смесью EtOAc/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (724 мг, 76%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 667/669 [M+H]⁺. Соотношение атропизомеров (ЖХ) 45:55.

Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 132

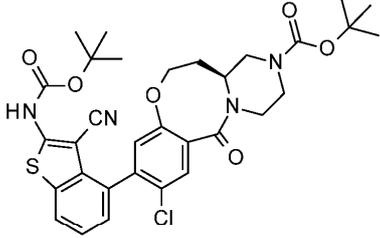
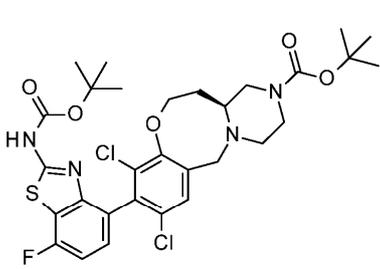
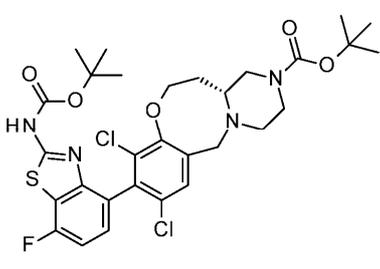
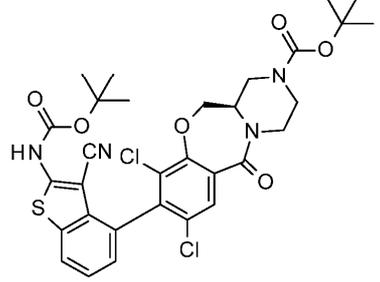
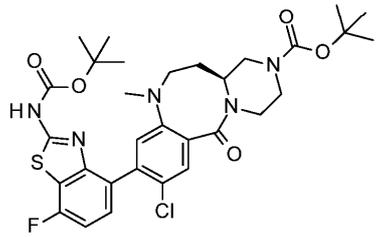
Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
133		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-9-хлор-7-фтор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	537,2/539,2
134		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	623,2/625,2
135		<i>трет</i> -Бутил-(4aS)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	623,2/625,2
136		<i>трет</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8-хлор-10-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	551,1/553,1

137		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	537,2/539,2
138		<i>трет</i> -Бутил-(4aS)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-7-хлор-9-фтор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	623,4/625,4
139		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-9-хлор-7-метил-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	533,2/534,2
140		<i>трет</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	551,0/553,0

141		<i>tert</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-10-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	533,0/535,0
142		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-7-хлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	519,0/521,0
143		<i>tert</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-бензотиазофен-4-ил]-10-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	539,0/541,0
144		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-бензотиазофен-4-ил]-7,9-дихлор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	645,4/647,4
145		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-бензотиазофен-4-ил]-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	587,2/589,2

146		<i>tert</i> -Бутил-(13aR)-9-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	533,0/535,0
147		<i>tert</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	533,0/535,0
148		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-9-хлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	519,0/521,0
149		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-7,9-дихлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	553,0/555,0
150		<i>tert</i> -Бутил-(4aS)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-7,9-дихлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	553,0/555,0

151		<i>трет</i> -Бутил-(4aS)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-9-хлор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	605,0/607,0
152		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-9-хлор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	605,0/607,0
153		<i>трет</i> -Бутил-(4aS)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-7,9-дихлор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	639,0/641,0
154		<i>трет</i> -Бутил-(4aS)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-7,9-дихлор-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	639,0/641,0
155		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-7-фторбензотиазол-4-ил]-9-хлор-7-фтор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	605,0/607,0

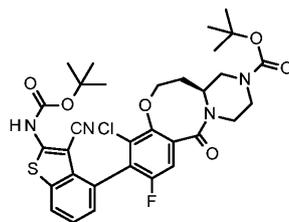
156		<i>трет</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-бензотиофен-4-ил]-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	639,2/641,2
157		<i>трет</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13а-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	653,0/655,2
158		<i>трет</i> -Бутил-(13aR)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13а-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	653,0/655,0
159		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-бензотиофен-4-ил]-7,9-дихлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	603,0/605,0
160		<i>трет</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8-хлор-11-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензодиазоцин-2-карбоксилат	646,2/648,2

161		<i>трет</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8-хлор-6-оксо-3,4,11,12,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	632,2/634,2
162		<i>трет</i> -Бутил-(13aR)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8-хлор-10-метил-6-оксо-1,3,4,11,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	645,2/647,2
163		<i>трет</i> -Бутил-(13aR)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8-хлор-10-метил-3,4,6,11,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	633,4/635,4
164		<i>трет</i> -Бутил-(13aR)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8,10-дихлор-6-оксо-1,3,4,11,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	665,2/667,2
165		<i>трет</i> -Бутил-(13aR)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8,10-дихлор-3,4,6,11,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	653,4/655,2
166		<i>трет</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8,10-дихлор-3,4,6,11,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	665,2/667,2

В некоторых случаях использовали K_2CO_3 вместо K_3PO_4 .

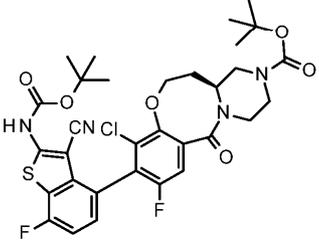
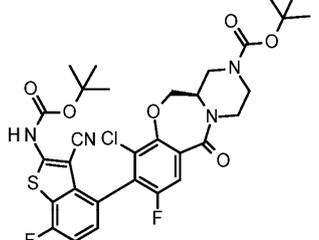
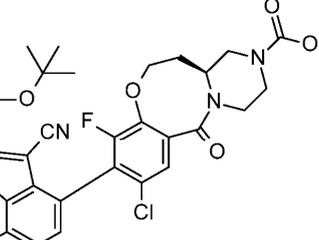
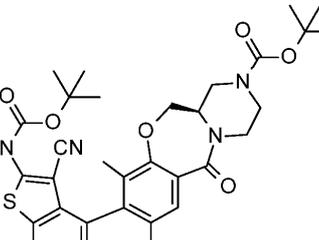
Подготовительный синтез 167.

трет-Бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбониламино)-3-циано-бензотиазол-4-ил]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат.



В герметично закрываемую колбу добавляли толуол (300 мл), трет-бутил-(13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-2-карбоксилат (6,20 г, 11,0 ммоль) и трет-бутил-N-[3-циано-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензотиофен-2-ил]карбамат (6,20 г, 15,5 ммоль). Через смесь пропускали азот в течение 30 мин и затем добавляли DPEPhosPdCl₂ (1,20 г, 1,68 ммоль), затем карбонат цезия (9,00 г, 27,6 ммоль). Закрывали колбу и перемешивали при 105°C в течение 6 часов. Охлаждали смесь до комнатной температуры и фильтровали через диатомовую землю, промывали EtOAc и концентрировали фильтрат в вакууме. Очищали остаток колоночной флэш-хроматографией, элюируя 0-30% смесью ацетон/гексан. Требуемый диастереомер элюировали после нежелательного диастереомера с получением указанного в заголовке соединения (главное, 3,50 г, 49%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 657,0/659,0 [M+H]⁺.

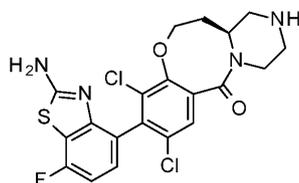
Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу
подготовительного синтеза 167

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
168		<i>tert</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-7-фторбензотиофен-4-ил]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	675,2/677,2
169		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-7-фторбензотиофен-4-ил]-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	605,2/607,2
170		<i>tert</i> -Бутил-(13aS)-9-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-7-фторбензотиофен-4-ил]-8-хлор-10-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	675,2/677,2
171		<i>tert</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>tert</i> -бутоксикарбониламино)-7-фтор-3-метилбензотиофен-4-ил]-9-хлор-7-метил-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	601,2/603,3

172		<i>трет</i> -Бутил-(4aR)-8-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-3-метилбензотиофен-4-ил]-9-хлор-7-метил-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагидро-1H-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-карбоксилат	583,2/585,2
173		<i>трет</i> -Бутил-(3R,13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-7-фторбензотиофен-4-ил]-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	689,2/691,2
174		<i>трет</i> -Бутил-(3S,13aS)-9-[2-(<i>трет</i> -бутоксикарбониламино)-3-циано-7-фторбензотиофен-4-ил]-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	633,4/635,4

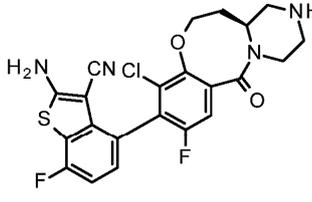
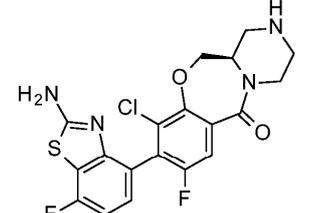
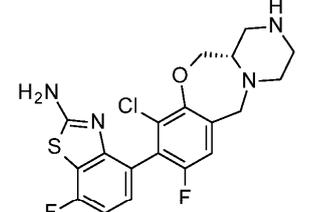
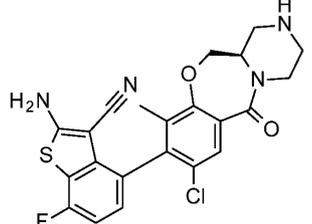
Подготовительный синтез 175.

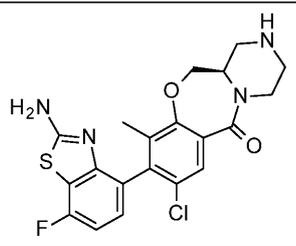
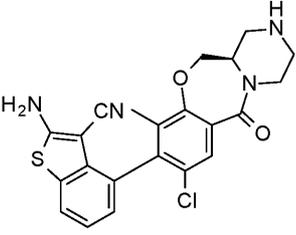
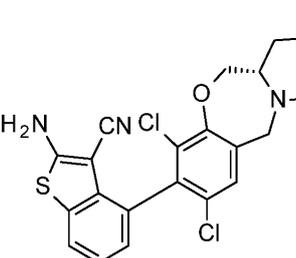
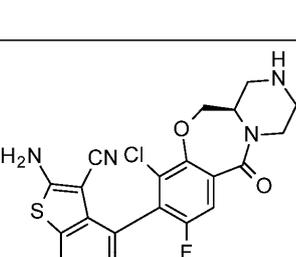
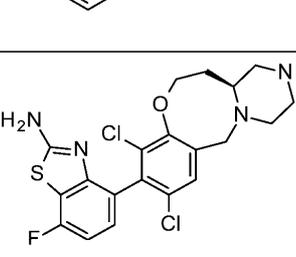
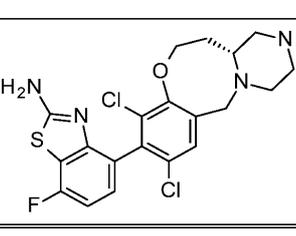
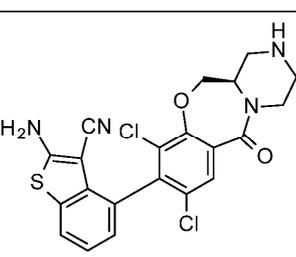
(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-2,3,4,12,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он.



трет-Бутил-(13aS)-9-[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил]-8,10-дихлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат (724 мг, 1,084 ммоль) растворяли в ДХМ (4 мл) и ТФК (2 мл, 26,45 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре. Через 6 часов концентрировали смесь в вакууме. Неочищенный продукт загружали на колонку SCX, промывали MeOH и элюировали 7 н. раствором NH₃ в MeOH. Концентрировали фильтрат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (500 мг, 98%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 467/469 [M+H]⁺.

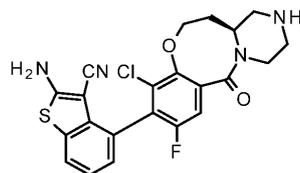
Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 175

Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
176		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	475,0/477,0
177		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7-хлор-9-фтор-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	437,2/439,2
178		4-[(4aS)-7-Хлор-9-фтор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	423,2/425,2
179		4-[(4aR)-9-Хлор-7-метил-11-оксо-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	457,2/459,2

180		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-7-метил-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	433,2/435,2
181		(4aR)-8-(2-Амино-3-метилбензотиофен-4-ил)-9-хлор-7-метил-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	439,1/441,2
182		4-[(4aS)-7,9-Дихлор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	445,0/447,0
183		4-[(4aR)-7-Хлор-9-фтор-11-оксо-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	443,2/445,2
184		4-[(13aS)-8,10-Дихлор-1,2,3,4,6,12,13,13а-октагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	453,0/455,0
185		4-[(13aR)-8,10-Дихлор-1,2,3,4,6,12,13,13а-октагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	453,0/455,0
186		4-[(4aR)-7,9-Дихлор-11-оксо-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	458,9/460,9

Подготовительный синтез 187.

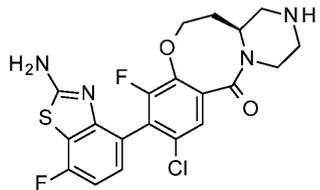
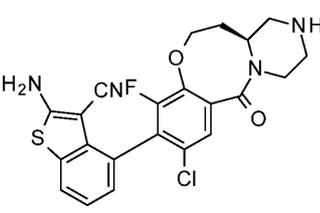
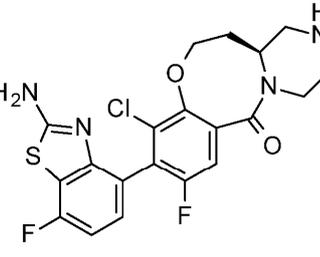
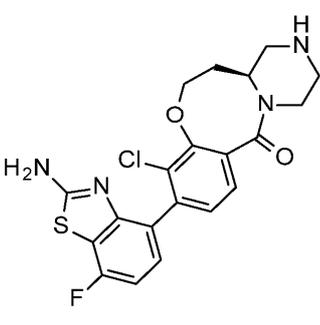
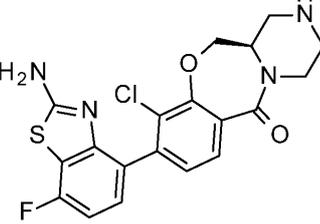
4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-9-ил]-2-аминобензотиофен-3-карбонитрил.

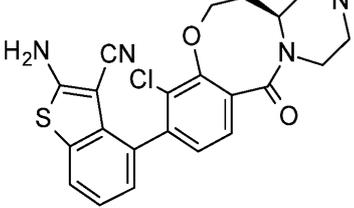
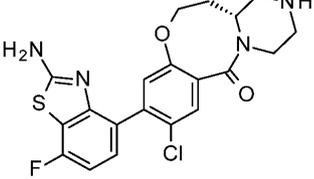
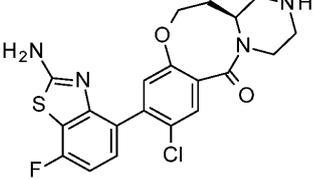
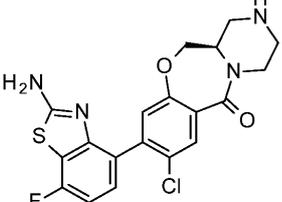
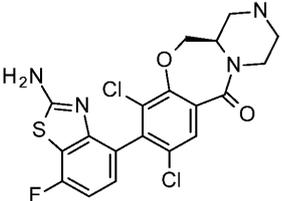
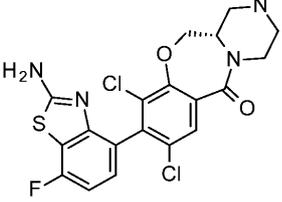


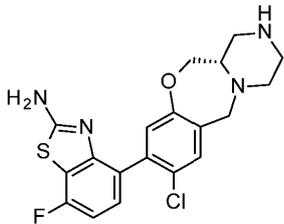
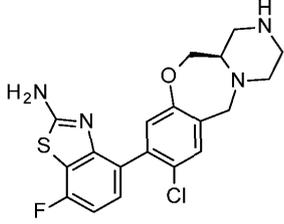
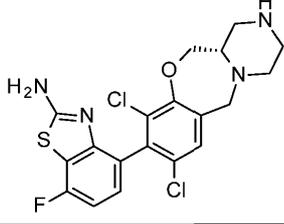
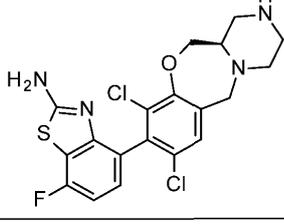
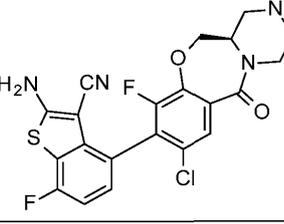
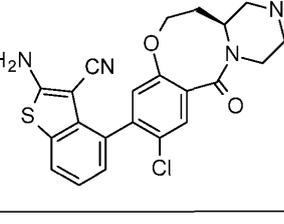
К суспензии трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбониламино)-3-циано-бензотиофен-4-ил]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-2-карбоксилата (2,64 г, 4,02 ммоль) в ДХМ (10,0 мл) при 0°C по каплям добавляли ТФК (10 мл). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 ч. Концентрировали смесь в вакууме, растворяли в EtOAc и снова концентрировали в вакууме. Указанный прием повторяли еще один раз. Полученный остаток очищали колонной флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя сначала 0-80% смесью (10% MeOH в ДХМ)/ДХМ, затем 0-100% смесью [10% (7 н. NH₃ в MeOH) в ДХМУДХМ, с получением указанного в заголовке соединения (1,58 г, 86%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 457,0/459,0 [M+H]⁺.

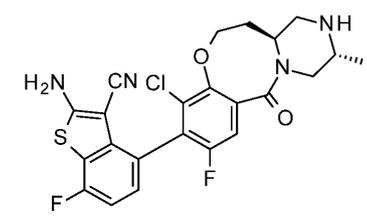
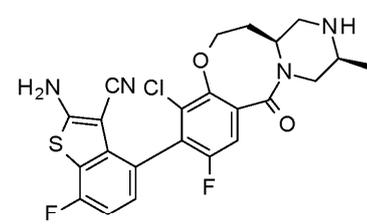
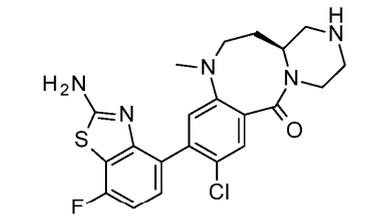
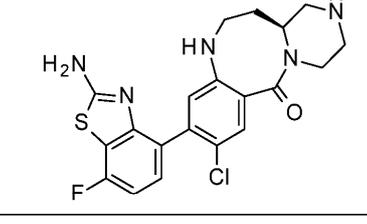
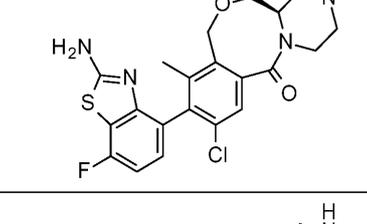
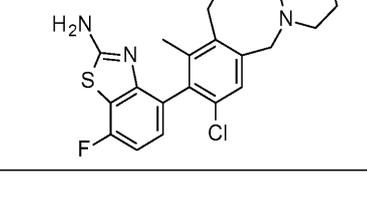
Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу подготовительного синтеза 187

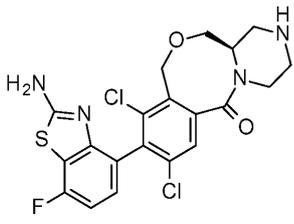
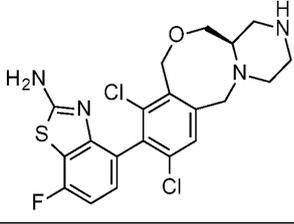
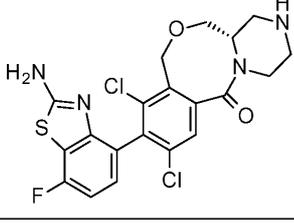
Подготовительный синтез	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
188		4-[(4aR)-9-Хлор-7-фтор-11-оксо-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	461,0/463,0
189		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-7-фтор-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	437,0/439,0
190		4-[(4aR)-9-Хлор-7-фтор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	423,0/425,0
191		4-[(4aS)-9-Хлор-7-фтор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	423,0/425,0
192		4-[(13aS)-8-Хлор-10-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	475,0/477,0

193		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-10-фтор-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	451,0/453,0
194		4-[(13aS)-8-Хлор-10-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	457,0/459,0
195		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-10-хлор-8-фтор-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	451,0/453,0
196		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-10-хлор-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	433,0/435,0
197		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7-хлор-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	419,0/421,0

198		4-[(13aS)-10-Хлор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	439,0/441,0
199		(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-6-он	433,0/435,0
200		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-6-он	432,9/435,0
201		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	418,9/420,9
202		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7,9-дихлор-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	452,8/454,8
203		(4aS)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7,9-дихлор-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	452,8/454,8

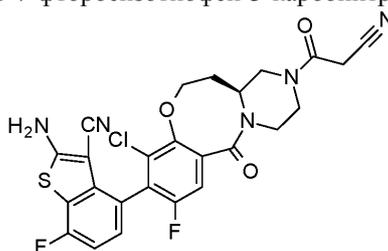
204		4-[(4aS)-9-Хлор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	405,0/407,0
205		4-[(4aR)-9-Хлор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	405,0/407,0
206		4-[(4aS)-7,9-Дихлор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	438,9/441,0
207		4-[(4aR)-7,9-Дихлор-2,3,4,4а,5,11-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	438,8/440,9
208		4-[(4aR)-9-Хлор-7-фтор-11-оксо-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	461,0/463,0
209		4-[(13aS)-8-Хлор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	439,0/441,0

210		4-[(3R,13aS)-10-Хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	489,0/491,0
211		4-[(3S,13aS)-10-Хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	489,2/491,2
212		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-11-метил-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензодиазоцин-6-он	446,0/448,0
213		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-1,2,3,4,11,12,13,13а-октагидропиразино[2,1-д][1,5]бензодиазоцин-6-он	432,0/434,0
214		(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-10-метил-2,3,4,11,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][2,5]бензоксазоцин-6-он	447,2/449,2
215		4-[(13aR)-8-Хлор-10-метил-1,2,3,4,6,11,13,13а-октагидропиразино[2,1-д][2,5]бензоксазоцин-9-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	433,2/435,2

216		(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-2,3,4,11,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][2,5]бензоксазоцин-6-он	467,2/469,2
217		4-[(13aR)-8,10-Дихлор-1,2,3,4,6,11,13,13а-октагидропиразино[2,1-д][2,5]бензоксазоцин-9-ил]-7-фтор-1,3-бензотиазол-2-амин	453,2/455,2
218		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-2,3,4,11,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][2,5]бензоксазоцин-6-он	467,2/469,2

Подготовительный синтез 219.

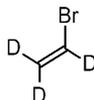
4-[(13aS)-10-Хлор-2-(2-цианоацетил)-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил.



Цианоуксусную кислоту (138 мг, 1,61 ммоль), 1-гидроксibenзотриазол (222 мг, 1,61 ммоль), DIEA (0,5 мл, 3 ммоль) и гидрохлорид 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида (306 мг, 1,60 ммоль) добавляли к суспензии 4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрила (500 мг, 1,05 ммоль) в ДХМ (10 мл). Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 18 ч, затем разбавляли ДХМ и промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Растворяли остаток в ДХМ (5 мл) и добавляли несколько капель MeOH, затем гексана, чтобы продукт выпал в осадок. Отфильтровывали осадок с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (410 мг, 72%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 542,4/544,4 [M+H]⁺.

Подготовительный синтез 220.

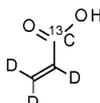
1-Бром-1,2,2-тридейтериоэтилен.



1,2-Дибромэтан-d4 (25,0 г, 130,28 ммоль) по каплям добавляли к раствору гидроксида калия (15,19 г, 243,63 ммоль) в 95% этаноле-OD (95 мл) и D₂O (5 мл) при 33°C. Сначала перемешивали смесь при 60°C в течение 1,5 ч и затем при 63°C в течение 1,5 ч с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного маслянистого вещества, которое непрерывно отгоняли из реакционной смеси во время нагревания и собирали в приемную колбу, охлаждаемую на бане из сухого льда и ацетона (7,3 г, 50%).

Подготовительный синтез 221.

2,3,3-Тридейтериопрор-1-еновая кислота-¹³C.



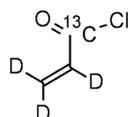
В колбу помещали магниевые стружки (1,67 г, 69,71 ммоль), кристалл иода и безводный ТГФ

(20 мл). В то же время получали раствор 1-бром-1,2,2-тридейтериоэтилена (7,3 г, 66,39 ммоль) в безводном ТГФ (30 мл). Смесь, содержащую магний, нагревали до 50°C и добавляли часть раствора винилбромида (2 мл). Нагревали смесь при 50°C до инициации реакции Гриньяра и начала кипения смеси (65°C) с обратным холодильником. Оставшийся раствор винилбромида в ТГФ по каплям добавляли при 55-65°C в течение 1,5 ч. Полученную смесь нагревали при 65°C в течение 1,5 ч, чтобы убедиться, что реакция завершена. Свежеполученный раствор (1,2,2-тридейтериовинил)магнийбромида в ТГФ охлаждали до комнатной температуры и сразу использовали.

Газообразный диоксид углерода-¹³C пропускали через безводный ТГФ (50 мл) при -65°C в течение 5 мин. По каплям добавляли вышеописанный свежеполученный раствор (1,2,2-тридейтериовинил)магнийбромида в ТГФ (66,39 ммоль), и в это время температура реакции поднималась до -20°C. Нагревали смесь до -10°C и перемешивали в течение 10 мин. Через смесь еще 2 минуты пропускали газообразный диоксид углерода-¹³C. Нагревали смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение 10 мин. Добавляли гидрохинон (10 мг), затем по каплям добавляли 6 М раствор серной кислоты (6,5 мл), чтобы погасить реакцию, поддерживая температуру ниже 20°C. Разбавляли смесь диэтиловым эфиром (400 мл) и добавляли сульфат натрия (100 г). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 5 мин, фильтровали и концентрировали в вакууме при 0-5°C с получением неочищенного продукта (7,5 г) в виде желтого маслянистого вещества. Неочищенный продукт очищали короткой вакуумной перегонкой с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного маслянистого вещества (1,2 г, 24%).

Подготовительный синтез 222.

Хлорангидрид 2,3,3-тридейтериопрор-2-еновой кислоты-¹³C.

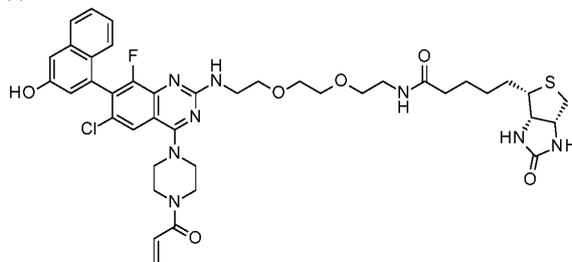


Оксалилхлорид (0,24 мл, 2,85 ммоль) добавляли к раствору 2,3,3-тридейтериопрор-2-еновой кислоты-¹³C (0,181 г, 2,38 ммоль) и ДМФА (1 капля) в безводном ДХМ (10 мл) при 0°C и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 ч. Указанное в заголовке соединение напрямую использовали на следующей стадии в виде раствора.

Подготовительный синтез 223.

Зонд Kras.

N-(2-{2-[2-(6-Хлор-8-фтор-7-(3-гидрокси-нафталин-1-ил)-4-[4-(проп-2-еноил)пиперазин-1-ил]хиназолин-2-ил]амино}этокси)этокси}этил)-5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]бензоксаз-4-ил]пентанамид.



Стадия А. трет-Бутил-4-(7-бром-2,6-дихлор-8-фторхиназолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат (0,51 г, 1,1 ммоль) и IPA (5 мл) объединяли в емкости для микроволнового реактора. Добавляли DIPEA (0,55 мл, 3,3 ммоль) и 5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]13бензоксаз-4-ил]-N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]пентанамид (0,48 г, 1,32 ммоль) и нагревали смесь до 120°C в микроволновом реакторе в течение шести часов. По истечении указанного времени разбавляли смесь насыщенным водным раствором хлорида аммония и 25% смесью IPA в CHCl₃ и разделяли слои. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 50-100% В в А (А: гексаны, В: 10% MeOH в ДХМ), с получением трет-бутил-4-{7-бром-6-хлор-8-фтор-2-[(2-{2-[2-(5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]13бензоксаз-4-ил]пентаноил}амино)этокси)этокси]этил}амино}хиназолин-4-ил}пиперазин-1-карбоксилата в виде желтого твердого вещества (0,68 г, 78%). ЭР/МС m/z: 819 (M+H).

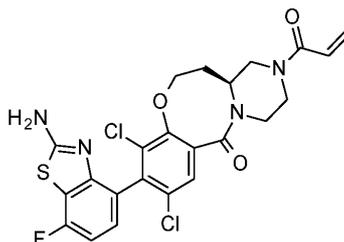
Стадия В. Объединяли трет-бутил-4-{7-бром-6-хлор-8-фтор-2-[(2-{2-[2-(5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]12бензоксаз-4-ил]пентаноил}амино)этокси)этокси]этил}амино}хиназолин-4-ил}пиперазин-1-карбоксилат (0,30 г, 0,37 ммоль), 1,4-диоксан (4 мл) и воду (0,75 мл). Добавляли карбонат калия (0,24 г, 1,11 ммоль), 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)нафталин-2-ол (0,20 г, 0,74 ммоль) и тетраакис(трифенилфосфин)палладий (0) (0,085 г, 0,074 ммоль) и перемешивали смесь при 85°C в атмосфере азота в течение 12 ч. По истечении указанного времени охлаждали смесь до комнатной температуры и фильтровали для удаления твердого вещества. Разбавляли фильтрат насыщен-

ным водным раствором хлорида аммония и EtOAc и разделяли слои. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 90-100% В в А (А: гексаны, В: 10% MeOH в ДХМ), с получением трет-бутил-4-{6-хлор-8-фтор-7-(3-гидроксинафталин-1-ил)-2-[(2-{2-[2-(5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]131ензоксаз-4-ил]пентаноил}амино)этокси)этокси]этил)амино]хиназолин-4-ил}пиперазин-1-карбоксилата в виде желтого твердого вещества (0,31 г, 96%). ЭР/МС m/z: 881 (M+H).

Стадия С. Раствор трет-бутил-4-{6-хлор-8-фтор-7-(3-гидроксинафталин-1-ил)-2-[(2-{2-[2-(5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]131ензоксаз-4-ил]пентаноил}амино)этокси)этокси]этил)амино]хиназолин-4-ил}пиперазин-1-карбоксилата (0,31 г, 0,35 ммоль) в MeOH (4 мл) охлаждали до 0°C. Добавляли HCl (3 M в MeOH, 6 мл, 17,5 ммоль) и перемешивали смесь при 0°C в течение 30 мин, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры. Через ~18 ч концентрировали реакционную смесь в вакууме. Разбавляли остаток ДХМ и снова концентрировали в вакууме. Полученный остаток разбавляли гексанами и перемешивали при комнатной температуре в течение двух часов. Полученное твердое вещество отфильтровывали и сушили под вакуумом с получением гидрохлорида N-{2-[2-(2-{6-хлор-8-фтор-7-(3-гидроксинафталин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)хиназолин-2-ил]амино)этокси)этокси]этил}-5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]132ензоксаз-4-ил]пентанамида. Полученную гидрохлоридную соль (0,19 г, 0,23 ммоль) нейтрализовали посредством объединения с DIEA (0,16 мл, 0,92 ммоль) в ДХМ (2,5 мл). Охлаждали смесь до -78°C и добавляли акрилоилхлорид (0,5 M в ДХМ, 0,4 мл, 0,21 ммоль). Через 30 мин нагревали смесь до комнатной температуры. Через один час разбавляли смесь MeOH (1 мл) и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали обращенно-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 35-60% В в А (А: 10 mM водный раствор NH₄HCO₃ с 5% MeOH; В: ACN), с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (0,027 г, 14%). ЭР/МС m/z: 835 (M+H).

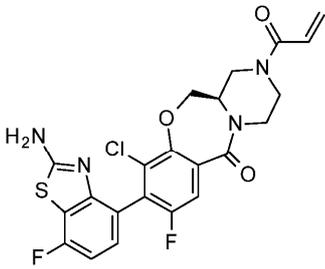
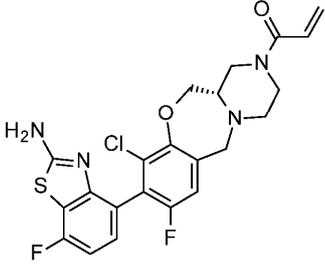
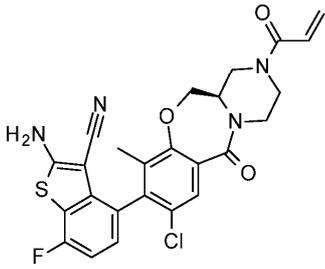
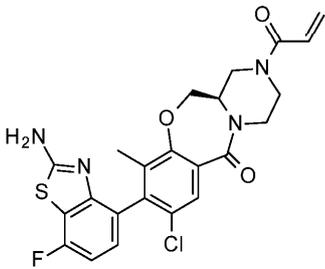
Пример 1.

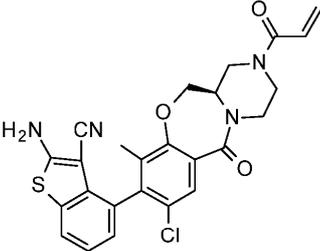
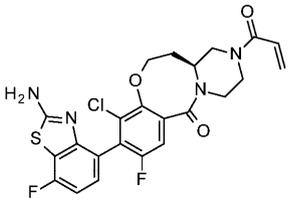
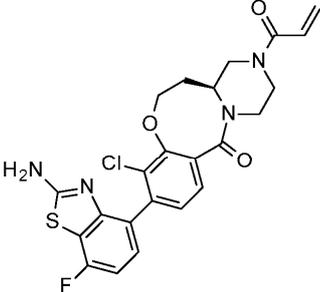
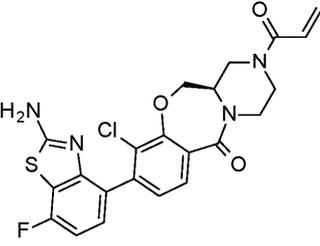
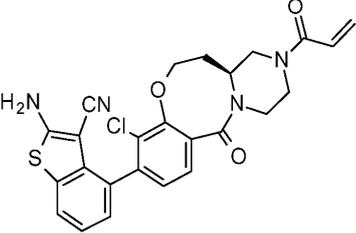
(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13a-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он.

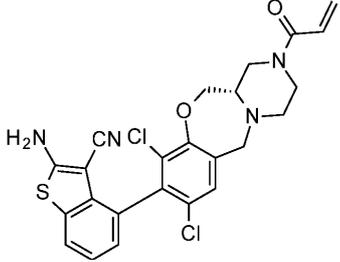
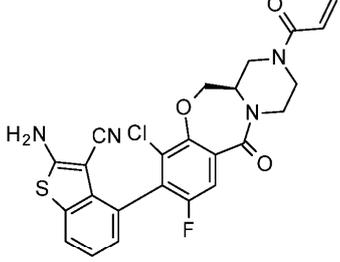
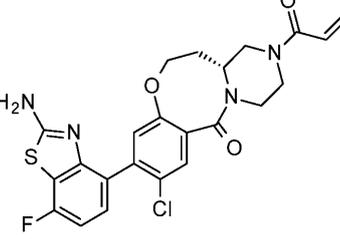
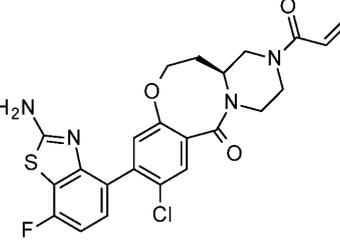
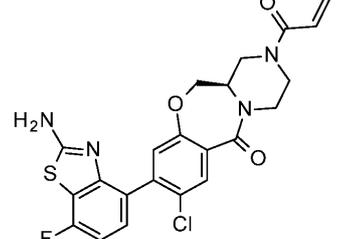


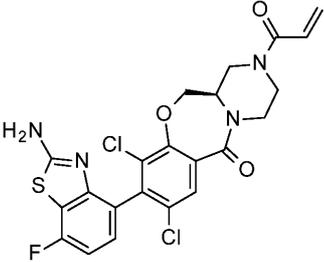
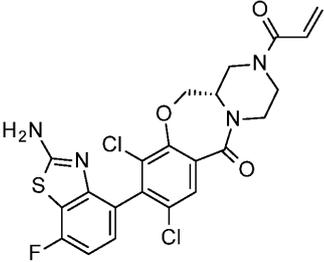
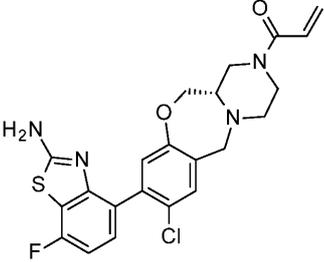
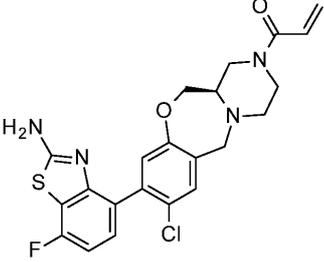
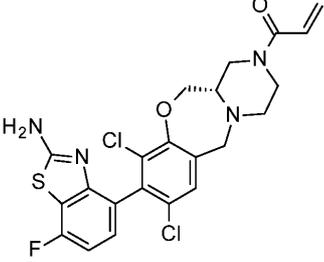
(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-2,3,4,12,13,13a-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он (500 мг, 1,070 ммоль) растворяли в ДХМ (5 мл) и ТЭА (0,75 мл, 5,4 ммоль). Охлаждали смесь до -78°C и затем добавляли акрилоилхлорид (0,085 мл, 1,0 ммоль) и перемешивали смесь при -78°C. Через 5 мин добавляли несколько капель изопропилового спирта при -78°C и затем концентрировали смесь в вакууме и подвергали обращенно-фазовой хроматографии с получением смеси двух атропизомеров. Разделяли смесь атропизомеров с помощью Chiralpak® 1C, 4,6×150 мм, 40% EtOH/CO₂, 5 мл/мин, 225 нм. Второе соединение, выходящее из колонки, идентифицировали как активный атропизомер (165 мг, 55%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 521/523 [M+H]⁺ (э.и. >98%). Менее активный атропизомер был первым выходящим из колонки (133 мг, 44%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 521/523 [M+H]⁺ (э.и. >98%).

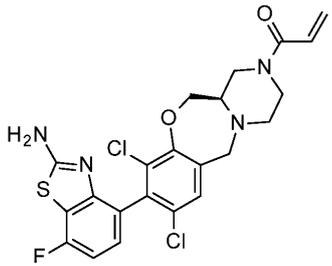
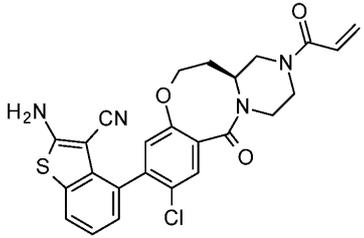
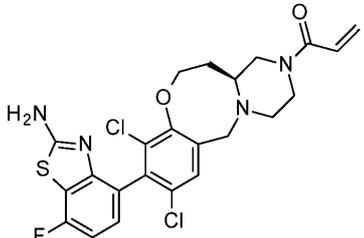
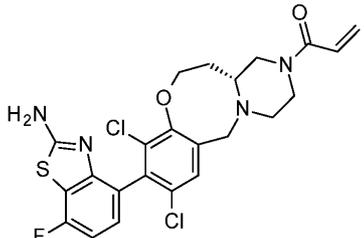
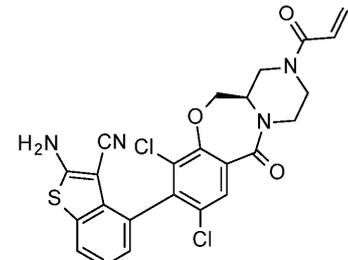
Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу примера 1

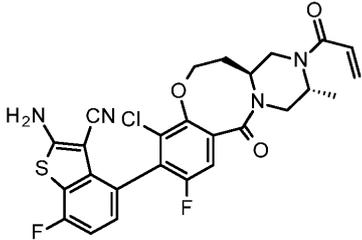
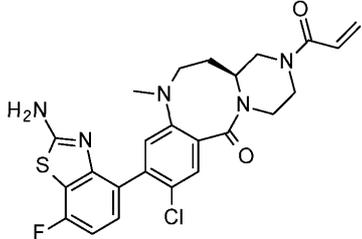
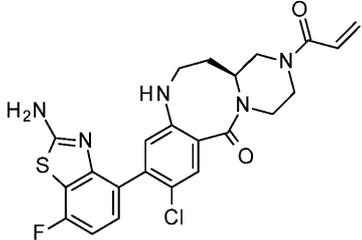
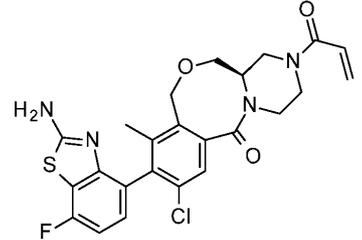
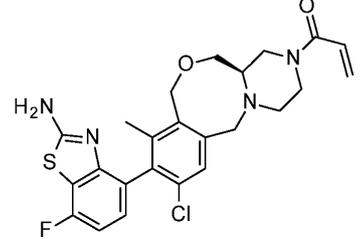
Пример	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
2		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7-хлор-9-фтор-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	491,2/493,2
3		1-[(4aS)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7-хлор-9-фтор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-ил]проп-2-ен-1-он	477,2/479,2
4		4-[(4aR)-9-Хлор-7-метил-11-оксо-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-7-фторбензотиафен-3-карбонитрил	511,0/513,0
5		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-7-метил-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	487,0/489,0

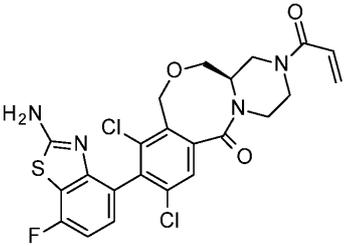
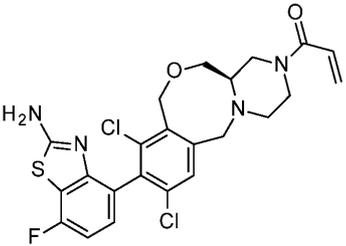
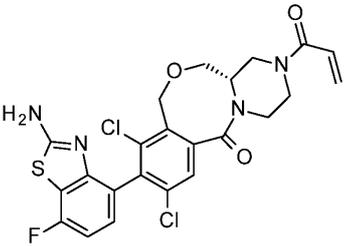
6		<p>(4aR)-8-(2-Амино-3-метилбензотиофен-4-ил)-7-хлор-9-метил-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он</p>	493,0/495,0
7		<p>(13аS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-10-хлор-8-фтор-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-6-он</p>	505,2/507,2
8		<p>(13аS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-10-хлор-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-6-он</p>	487,0/489,0
9		<p>(4аR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7-хлор-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он</p>	473,0/475,0
10		<p>4-[(13аS)-10-Хлор-6-оксо-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил</p>	493,0/495,0

11		4-[(4aS)-7,9-Дихлор-3-проп-2-еноил-1,2,4,4a,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	499,2/501,2
12		4-[(4aR)-7-Хлор-9-фтор-11-оксо-3-проп-2-еноил-2,4,4a,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	497,2/499,2
13		(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	487,0/489,0
14		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	487,0/489,0
15		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-3-проп-2-еноил-2,4,4a,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	473,0/475,0

16		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7,9-дихлор-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	507,0/509,0
17		(4aS)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7,9-дихлор-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	506,9/508,8
18		1-[(4aS)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-ил]проп-2-ен-1-он	459,0/461,0
19		1-[(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-ил]проп-2-ен-1-он	459,0/461,0
20		1-[(4aS)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7,9-дихлор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-ил]проп-2-ен-1-он	493,0/495,0

21		1-[(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7,9-дихлор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-ил]проп-2-ен-1-он	493,0/495,0
22		4-[(13aS)-8-Хлор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	493,0/495,0
23		1-[(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-ил]проп-2-ен-1-он	507,0/509,0
24		1-[(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-ил]проп-2-ен-1-он	507,0/509,0
25		4-[(4aR)-7,9-Дихлор-11-оксо-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	513,0/515,0

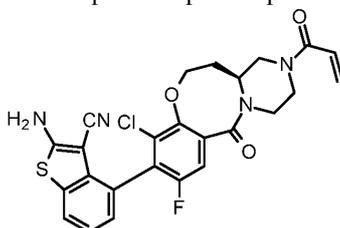
26		4-[(3R,13aS)-10-Хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	543,0/545,0
27		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-11-метил-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензодиазоцин-6-он	500,0/502,0
28		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-2-проп-2-еноил-3,4,11,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензодиазоцин-6-он	486,0/488,0
29		(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-10-метил-2-проп-2-еноил-1,3,4,11,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	501,0/503,0
30		1-[(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-10-метил-3,4,6,11,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-ил]проп-2-ен-1-он	487,0/489,0

31		(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-2-проп-2-еноил-1,3,4,11,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	521,2/523,2
32		1-[(13aR)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-3,4,6,11,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-ил]проп-2-ен-1-он	507,0/509,0
33		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8,10-дихлор-2-проп-2-еноил-1,3,4,11,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	521,0/523,0

В некоторых случаях использовали DIEA вместо ТЭА.

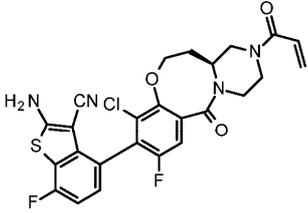
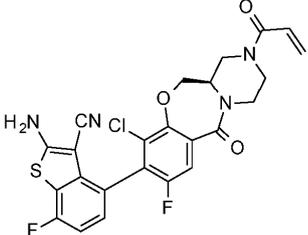
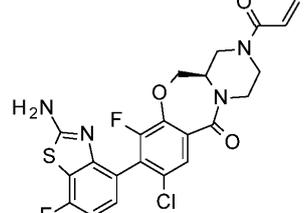
Пример 34.

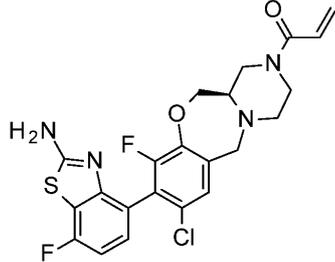
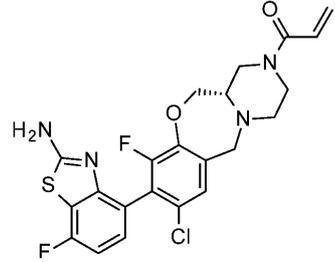
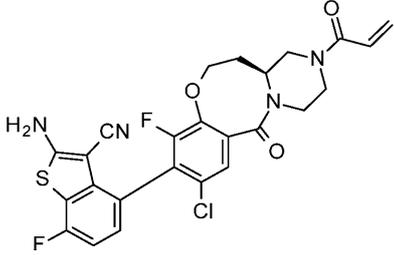
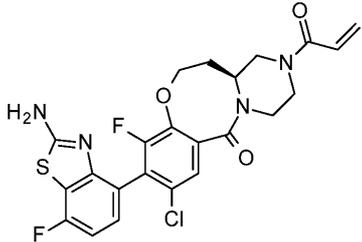
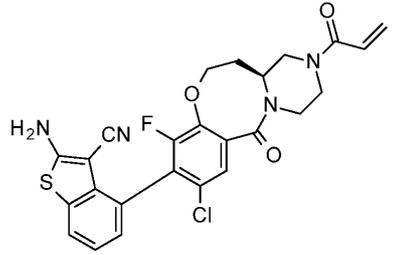
4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-аминобензотиофен-3-карбонитрил.

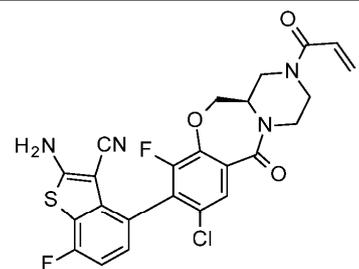
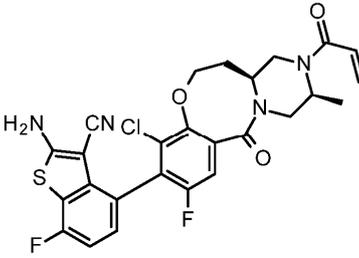
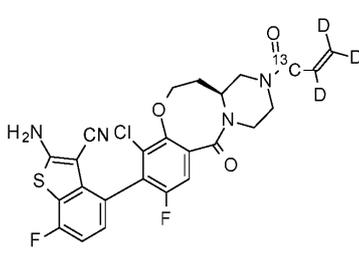


В суспензию 4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1Н-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-аминобензотиофен-3-карбонитрила (1,58 г, 3,46 ммоль) в EtOAc (35 мл), ТГФ (15 мл) и воду (40 мл) добавляли карбонат калия (1,90 г, 13,7 ммоль). Быстро перемешивали смесь и охлаждали до 0°C. По каплям добавляли акрилоилхлорид в ДХМ (13,0 мл, 3,25 ммоль, 0,25 М) через капельную воронку. Через 10 мин перемешивания на ледяной бане разбавляли смесь EtOAc и выливали в делительную воронку. Разделяли слои и снова экстрагировали водный слой EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очищали остаток колоночной флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя сначала 0-100% смесью (10% MeOH в ДХМ)/ДХМ, а затем 0-100% смесью [10% (7 н. NH₃ в MeOH) в ДХМ]/ДХМ, с получением требуемого продукта в виде рыхлого твердого вещества. Полученное твердое вещество обрабатывали ультразвуком в эфире в течение 30 мин, фильтровали и сушили в высоком вакууме с получением указанного в заголовке соединения (1,60 г, 91%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 511,0/513,0 [M+H]⁺.

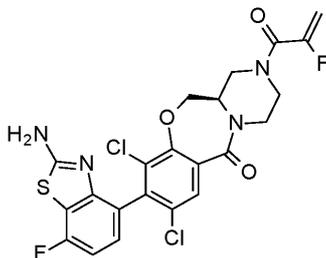
Соединения, синтезированные способом, по существу аналогичным способу примера 34

Пример	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
35		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиперазино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	529,0/531,0
36		4-[(4aR)-7-Хлор-9-фтор-11-оксо-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиперазино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	515,0/517,0
37		(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-7-фтор-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиперазино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-он	491,0/493,0

38		1-[(4aR)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-ил]проп-2-ен-1-он	477,0/479,0
39		1-[(4aS)-8-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4а,5,11-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-3-ил]проп-2-ен-1-он	477,0/479,0
40		4-[(13aS)-8-Хлор-10-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	529,0/531,0
41		(13aS)-9-(2-Амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-8-хлор-10-фтор-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-6-он	505,0/507,0
42		4-[(13aS)-8-Хлор-10-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазацин-9-ил]-2-амино-бензотиофен-3-карбонитрил	511,0/513,0

43		4-[(4aR)-9-Хлор-7-фтор-11-оксо-3-проп-2-еноил-2,4,4а,5-тетрагидро-1Н-пиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-8-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	515,0/517,0
44		4-[(3S,13aS)-10-Хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2-проп-2-еноил-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	542,4/544,4
45		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2-(2,3,3-тридейтериопрор-2-еноил)-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил- ¹³ C	533,1/535,1

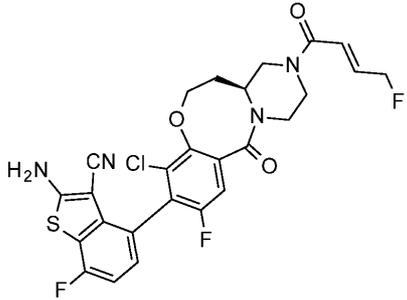
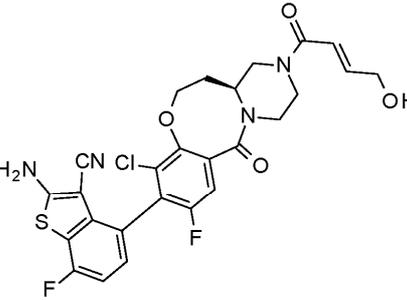
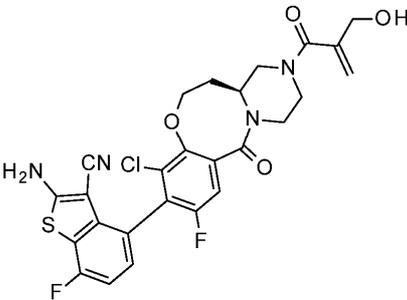
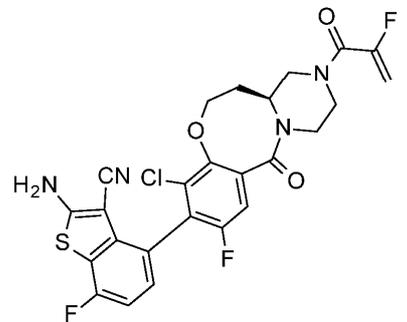
Пример 46.



К раствору (4aR)-8-(2-амино-7-фтор-1,3-бензотиазол-4-ил)-7,9-дихлор-1,2,3,4,4а,5-гексагидропиразино[2,1-с][1,4]бензоксазепин-11-она (46 мг, 0,10 ммоль), 2-фторпроп-2-еновой кислоты (11 мг, 0,12 ммоль), DIEA (53 мкл, 0,30 ммоль) в ДМФА (1 мл), охлажденному на ледяной бане при 0°C, добавляли 50 мас.% раствор пропилфосфонового ангидрида в EtOAc (91 мкл, 0,15 ммоль). Через 45 мин концентрировали реакционную смесь в вакууме. Неочищенную смесь очищали обращенно-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 20-80% В в А (А: 10 мМ водный раствор NH₄HCO₃ с 5% MeOH; В: ACN), с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (25 мг, 47%). ЭР/МС m/z: 525 (M+H).

Соединения, синтезированные способом, по существу
аналогичным способу примера 46

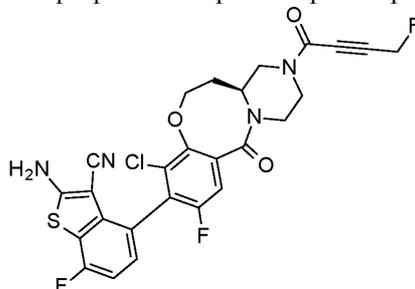
При мер	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M + H)
47		4-[(13aS)-10-Хлор-2-[(E)-4,4-дифторбут-2-еноил]-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	579,5/581,4
48		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2-[2-(трифторметил)проп-2-еноил]-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	597,5/599,5
49		4-[(13aS)-10-Хлор-2-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	586,6/588,6

50		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-[(E)-4-фторбут-2-еноил]-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	561,5/563,5
51		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-[(E)-4-гидроксибут-2-еноил]-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	559,4/561,4
52		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-[2-(гидроксиметил)проп-2-еноил]-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	559,4/561,4
53		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-(2-фторпроп-2-еноил)-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	547,0/549,0

54		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-[(E)-4-метоксибут-2-еноил]-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	573,6/575,6
55		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-[(E)-4-морфолинобут-2-еноил]-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	628,6/630,6
56		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-(4-гидроксибут-2-иноил)-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	557,5/559,4
57		4-[(13aS)-2-Бут-2-иноил-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	541,4/543,4

Пример 58.

4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-(4-фторбут-2-иноил)-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил.

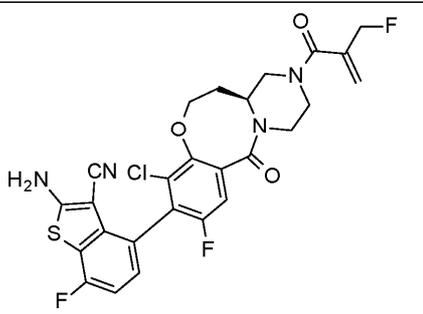


Трифторид диэтиламиносеры (0,03 мл, 0,2 ммоль) через шприц по каплям добавляли в закрытую колбу, содержащую охлажденный до 0°C раствор 4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-(4-гидроксибут-2-иноил)-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрила (120 мг, 0,215 ммоль) в ДХЭ (2 мл). Перемешивали реакционную смесь в течение 30 мин и затем разбавляли водой и 25% раствором IPA/хлороформ. Отделяли органический слой, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-100% градиентом 10% (7 М NH₃ в ДХМ)/ДХМ, и до-

полнительно очищали обращенно-фазовой хроматографией с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (7 мг, 6%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 559,4/561,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

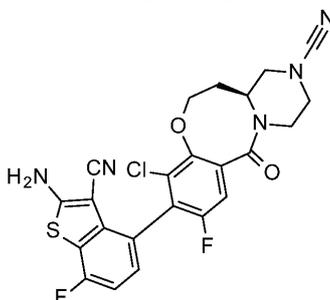
Таблица 24

Соединение, синтезированное способом, по существу аналогичным способу примера 57

Пример	Структура	Название соединения	ЭР/МС m/z (M+H)
59		4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-[2-(фторметил)проп-2-еноил]-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил	561,4/563,5

Пример 60.

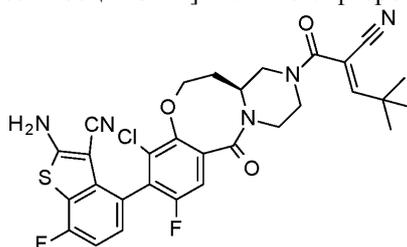
(13aS)-9-(2-Амино-3-циано-7-фторбензотиофен-4-ил)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбонитрил.



Бромистый циан (3 М в ДХМ, 0,15 мл, 0,45 ммоль) добавляли в колбу, содержащую 4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагидро-1H-пиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил (100 мг, 0,211 ммоль) и 1 н. NaOH (1 мл) в ДХМ (1 мл). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 18 ч, затем разбавляли водой и 25% раствором IPA/хлороформ. Отделяли органический слой, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали обращенно-фазовой хроматографией с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (29 мг, 27%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 517,0/519,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример 61.

4-[(13aS)-10-Хлор-2-(E)-2-циано-4,4-диметилпент-2-еноил]-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил.



В колбу для микроволнового реактора объемом 20 мл загружали 4-[(13aS)-10-хлор-2-(2-цианоацетил)-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагидропиразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-ил]-2-амино-7-фторбензотиофен-3-карбонитрил (0,410 г, 0,756 ммоль), EtOH (8 мл), пиперидин (0,15 мл, 1,5 ммоль) и триметилацетальдегид (0,7 мл, 6 ммоль) и закрывали крышкой с диафрагмой. Нагревали реакционную смесь в микроволновом реакторе при 120°C в течение 60 мин, еще 90 мин при 120°C и еще 1 ч при 100°C, затем концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя 0-50% смесью ацетон:ДХМ, с получением указанного в заголовке продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (117 мг, 25%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 610,6/612,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Биологические анализы

Следующие анализы демонстрируют, что иллюстративные соединения являются ингибиторами G12C KRas и ингибируют рост некоторых опухолей *in vitro* и/или *in vivo*.

Анализ занятости зонда G12C KRas методом резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET).

Цель данного анализа заключалась в измерении способности ингибитора конкурировать с зондом за связывание и ковалентную модификацию G12C KRas в 12 кодоне. Сигнал создавали посредством время-разрешенного переноса энергии флуоресценции между европием в антителе, связанном с G12C KRas, в антителе против гистидиновой метки, меченном европием, LanthaScreen (антитело Eu-анти-His), и флуоресцентным трейсером 647 (Alexa Fluor™), связанным с KRas G12C через страптавидин и биотинилированный ингибитор ("зонд KRas", см. подготовительный синтез 223).

Ингибиторы тестировали в дозозависимом формате, исходя из 10 мМ маточных растворов в 100% ДМСО. Использовали Labcyte Echo® 555 для разбавления и переноса 100 нл на лунку в аналитическом планшете, содержащем 10-точечные 2,8-кратные серийные разбавления. Получали две копии аналитического планшета для измерения активности через 5 и 60 мин инкубации ингибитора с G12C KRas. На планшеты добавляли G12C KRas с меткой His (20 нМ) в аналитическом буфере (20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,01% TX-100 и 1 мМ DTT). Через 5 или 60 мин инкубации добавляли 1 мкМ зонд KRas и оставляли для ковалентной модификации свободного G12C KRas на 1 ч. Разбавляли в 4 раза в буфере, содержащем Eu-анти-His антитело и трейсер 647 со страптавидиновым покрытием (оба производства компании Life Technologies) с получением смеси G12C KRas (5 нМ), анти-His антитела (2 нМ), зонда KRas (300 нМ) и трейсера 647 со страптавидиновым покрытием (500 нМ). Через 30 мин считывали флуоресцентный сигнал на планшетридере EnVision™ (возбуждение при 340 нм, испускание трейсера (исп.) при 665 нм, испускание антитела при 615 нм). Контрольные лунки максимального ответа не содержали ингибитора, а контрольные лунки минимального ответа не содержали ни ингибитор, ни G12C KRas. Отношение сигналов (исп. при 665/исп. при 615) пересчитывали в процентное ингибирование по следующему уравнению: % Ингибирование = 100-[(сигнал экспериментального соединения - медианный минимальный сигнал)/(медианный максимальный сигнал - медианный минимальный сигнал)×100]. IC₅₀ определяли посредством подгонки процентного ингибирования при каждой концентрации ингибитора к четырехпараметрическому нелинейному логистическому уравнению с помощью Genedata Screener®:

$$y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))),$$

где y = % ингибирование, A = асимптота минимума, B = асимптота максимума, C = относительная IC₅₀ или концентрация ингибитора, вызывающая 50% ингибирование в пределах нанесенного по точкам диапазона обеих асимптот, и D = угол наклона. Соединения, входящие в объем настоящего изобретения, анализировали в указанном анализе по существу так, как описано выше. Иллюстративные соединения согласно настоящему изобретению, испытанные в данном анализе, демонстрировали активность ингибитора G12C KRas на основании конкуренции с зондом за связывание и ковалентную модификацию G12C KRas в 12 кодоне. Например, соединение из примера 1, испытанное в данном анализе, демонстрировало IC₅₀ менее 0,015 мкМ через 5 и 60 мин, n = 4.

Анализ AlphaLISA® фосфо-ERK в клетках H358.

Цель данного анализа заключалась в измерении способности экспериментальных соединений ингибировать фосфорилирование p-ERK1/2, нисходящего эффектора KRas, в клетках рака легких человека H358 (ATCC CRL-5807). Вкратце, анализ AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) представляет собой сэндвич-иммуноанализ для количественного выявления фосфо-ERK 1/2 (фосфорилированного по Thr202/Tyr204 в ERK1 или по Thr185/Tyr187 в ERK2) в клеточных лизатах с применением технологии Alpha (Perkin Elmer, кат. № ALSU-PERK-A50K).

Клетки H358 высевали на планшет с плотностью 40К клеток на лунку в 100 мкл среды (RPMI 1640, GIBCO, кат. № 22400-071), содержащей 10% FBS (GIBCO, кат. №: 10082-147) в 96-луночный планшет (Costar № 3596) и инкубировали в течение ночи во влажных лотках при 37°C, 5% CO₂. На следующее утро на планшет с клетками добавляли 10 мкл серийно разбавленных (3-кратно) экспериментальных соединений (наибольшая концентрация 50 мкМ) и 10 мкл контрольных растворов (лунки максимального сигнала: 5% ДМСО и лунки минимального сигнала: 2 мкМ N-(3-{3-циклопропил-5-[(2-фтор-4-иодфенил)амино]-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидропиридо[4,3-D]пиримидин-1(2H)-ил}фенил)ацетамида (траметиниб, в качестве положительного контроля) и инкубировали в течение 2 ч во влажных лотках при 37°C/5% CO₂. Получали лизисный буфер комнатной температуры, содержащий коктейль из ингибитора протеазы и фосфатазы. Удаляли культуральную среду посредством переворачивания и встряхивания клеточного планшета в раковине с последующим промакиванием бумажным полотенцем. В клеточный планшет добавляли лизисный буфер (50 мкл на лунку) и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 10 мин на встряхивателе. Для обнаружения p-ERK разбавляли акцепторные гранулы в смеси суспензии с буфером. С помощью жидкостного манипулятора STARlet переносили 5 мкл акцепторных гранул и 2 мкл клеточного лизата в качестве одностадийного разбавления в наконечнике пипетки в 384-луночный аналитический планшет. Аналитический планшет закрывали фольгой и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Донорные гранулы разбавляли в смеси суспензии с буфером. С помощью STARlet добавляли 5 мкл донорных гранул в аналитический планшет, который затем закрывали, оборачивали фольгой. Инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 2 ч в темноте. Затем считывали аналитический планшет на планшетридере EnVision™ (Perkin Elmer), используя программу люминесценции.

Сигнал пересчитывали в процентное ингибирование по следующему уравнению:

% Ингибирование = $100 - \frac{(\text{сигнал экспериментального соединения} - \text{медианный минимальный сигнал})}{(\text{медианный максимальный сигнал} - \text{медианный минимальный сигнал})} \times 100$.

Максимальный сигнал представляет собой сигнал контрольной лунки без ингибитора. Минимальный сигнал представляет собой сигнал контрольной лунки, содержащей эталонный ингибитор, достаточный для полного ингибирования активности. IC₅₀ определяли посредством подгонки процентного ингибирования при каждой концентрации ингибитора к четырехпараметрическому нелинейному логистическому уравнению с помощью Genedata Screener®:

$$y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$$

где y = % ингибирование, A = асимптота минимума, B = асимптота максимума, C = относительная IC₅₀ или концентрация ингибитора, вызывающая 50% ингибирование в пределах нанесенного по точкам диапазона обеих асимптот, и D = угол наклона.

Соединения, входящие в объем настоящего изобретения, анализировали в указанном анализе по существу так, как описано выше. Соединения из предложенных примеров демонстрируют способность ингибировать фосфорилирование p-ERK1/2. Например, соединение из примера 1 в данном анализе демонстрирует относительную IC₅₀ 0,00178 мкМ, n = 3. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения из предложенных примеров демонстрируют ингибирующую активность в отношении G12C KRas в данном клеточном анализе.

Иммуноферментный твердофазный анализ активной ГТФазы RAS в клетках H358.

Цель данного анализа заключалась в измерении способности экспериментальных соединений ингибировать конститутивную активность ГТФазы RAS в клетках рака легких человека H358 (ATCC CRL-5807). Набор для иммуноферментного твердофазного анализа ГТФазы RAS (Active Motif, кат. № 52097) содержит 96-луночный планшет, предварительно покрытый глутатионом для захвата белка GST-Raf-RBD, поставляемого в том же наборе. Активированный RAS (связанный с ГТФ) в клеточных экстрактах специфически связывается с Raf-RBD. Связанный RAS обнаруживают с помощью первичного антитела, распознающего человеческий KRas. Вторичное антитело, конъюгированное с HRP, распознает первичное антитело, а проявляющий раствор обеспечивает получение хемиллюминесцентных показаний.

Клетки H358 высевали на планшет с плотностью 80000 клеток на лунку в 90 мкл бессывороточной среды (RPMI 1640, GIBCO) и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На следующее утро на планшет с клетками добавляли 10 мкл серифно разбавленных (3-кратно) экспериментальных соединения (наибольшая концентрация 500 мкМ) и 10 мкл контрольных растворов (лунки максимального сигнала: 5% ДМСО и лунки минимального сигнала: 500 мкМ 1-[4-[6-хлор-8-фтор-7-(3-гидрокси-1-нафтил)хиназолин-4-ил]пиперазин-1-ил]проп-2-ен-1-он, WO 2015054572 в качестве ингибитора) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C/5% CO₂. Получали полный лизисный/связывающий буфер, содержащий коктейль ингибитора протеазы и GST-Raf-RBD, и хранили на льду. За час до завершения инкубации клеточного планшета разбавляли 50 мкл GST-Raf-RBD в лизисном/связывающем буфере и добавляли буфер на аналитический планшет для иммуноферментного твердофазного анализа, и инкубировали планшет в течение 1 ч при 4°C при легком покачивании. Через 2 ч промывали клетки, используя 100 мкл ледяного PBS, и лизировали, используя 100 мкл лизисного/связывающего буфера. Клеточный планшет встряхивали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали клеточный планшет при 1500 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. В это время получали 1X промывочный буфер комнатной температуры и затем использовали для промывания (3×100 мкл) аналитического планшета, покрытого GST-Raf-RBD. После промывания добавляли 50 мкл клеточного лизата на аналитический планшет, покрытый GST-Raf-RBD, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при слабом встряхивании. Во время периода инкубации получали 1X буфер для связывания антитела и довели его до комнатной температуры. Аналитический планшет промывали 3×100 мкл, используя 1X промывочный буфер, и затем добавляли 50 мкл первичного антитела (разбавленного 1:500 в 1x буфере для связывания антитела). Инкубировали планшет в течение 1 ч при комнатной температуре. Аналитический планшет промывали 3×100 мкл, используя 1X промывочный буфер, и затем добавляли 50 мкл вторичного антитела (разбавленного 1:5000 в 1X буфере для связывания антитела), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Промывали аналитический планшет 1X промывочным буфером 4×100 мкл и затем добавляли 50 мкл хемиллюминесцентного рабочего раствора при комнатной температуре. Затем считывали аналитический планшет на планшетридере EnVision™ (Perkin Elmer), используя программу люминесценции.

Сигнал пересчитывали в процентное ингибирование по следующему уравнению:

% Ингибирование = $100 - \frac{(\text{сигнал экспериментального соединения} - \text{медианный минимальный сигнал})}{(\text{медианный максимальный сигнал} - \text{медианный минимальный сигнал})} \times 100$.

Максимальный сигнал представляет собой сигнал контрольной лунки без ингибитора. Минимальный сигнал представляет собой сигнал контрольной лунки, содержащей эталонный ингибитор, достаточный для полного ингибирования активности. IC₅₀ определяли посредством подгонки процентного ингибирования при каждой концентрации ингибитора к четырехпараметрическому нелинейному логистическому уравнению с помощью Genedata Screener®:

$$y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))),$$

где y = % ингибирование, A = асимптота минимума, B = асимптота максимума, C = относительная IC_{50} или концентрация ингибитора, вызывающая 50% ингибирование в пределах нанесенного по точкам диапазона обеих асимптот, и D = угол наклона.

Соединения, входящие в объем настоящего изобретения, анализировали в указанном анализе по существу так, как описано выше. Соединения из приведенных примеров демонстрируют способность ингибировать конститутивную активность ГТФазы RAS. Например, соединение из примера 1 в данном анализе демонстрирует относительную IC_{50} 0,00672 мкМ, $n = 4$. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения из приведенных примеров проявляют ингибирующую активность в отношении KRas-ГТФ в данной культуре клеток рака легких человека.

3D анализ пролиферации клеток H358.

Цель данного анализа заключалась в оценке ингибирования экспериментальных соединений в 3D анализе пролиферации с использованием клеток рака легких человека H358 (ATCC CRL-5807). Сигнал, отражающий клеточную пролиферацию, обнаруживали с помощью реагента CellTiterGlo® 3D (Promega G9683). Клетки выращивали в среде RPMI 1640 (GIBCO®) с добавлением 10% термически инактивированной FBS и 0,1 мг/мл пенициллина/стрептомицина. Клетки H358 выращивали на фазе роста и высевали пять тысяч клеток на лунку в черный круглодонный 96-луночный планшет с прозрачным дном и с поверхностью со сверхнизким связыванием (Corning®, кат. 4520), с 80 мкл культуральной среды на лунку. Инкубировали клетки в течение ночи при 37°C во влажной камере. На планшет добавляли 20 мкл/лунка серийно разбавленного экспериментального соединения и затем инкубировали в течение 96 часов. Доводили планшеты до комнатной температуры и добавляли равный объем реагента CellTiterGlo® 3D комнатной температуры. Встряхивали планшеты при 750 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Через 1 ч инкубации при комнатной температуре для стабилизации сигнала измеряли люминесцентный сигнал на планшетриде EnVision™. Сигнал пересчитывали в процентное ингибирование по следующему уравнению:

% Ингибирование = $100 - [(\text{сигнал экспериментального соединения} - \text{медианный минимальный сигнал}) / (\text{медианный максимальный сигнал} - \text{медианный минимальный сигнал}) \times 100]$.

Максимальный сигнал представляет собой сигнал контрольной лунки без ингибитора. Минимальный сигнал представляет собой сигнал контрольной лунки, содержащей эталонный ингибитор (траметиниб), достаточный для полного ингибирования клеточной пролиферации. IC_{50} определяли посредством подгонки процентного ингибирования при каждой концентрации ингибитора к четырехпараметрическому нелинейному логистическому уравнению с помощью Genedata Screener®:

$$y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))),$$

где y = % ингибирование, A = асимптота минимума, B = асимптота максимума, C = относительная IC_{50} или концентрация ингибитора, вызывающая 50% ингибирование в пределах нанесенного по точкам диапазона обеих асимптот, и D = угол наклона.

Соединения, входящие в объем настоящего изобретения, анализировали в указанном анализе по существу так, как описано выше. Например, соединение из примера 1 в данном анализе демонстрирует относительную IC_{50} 0,0083 мкМ. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединение из примера 1 ингибирует пролиферацию клеток рака легких человека H358.

Анализ клеточной пролиферации CellTiterGlo®.

Цель данного анализа заключалась в оценке роста опухолевых линий, мутантных по G12C KRas, после обработки экспериментальным соединением. Собирали панель опухолевых клеточных линий, несущих мутацию G12C KRas или другие мутации KRas (таблица 25). Все клеточные линии приобретали у ATCC или из других указанных источников.

Обычно клетки выращивали в среде RPMI1640 или в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM, GIBCO) с добавлением 10% FBS (GIBCO, Invitrogen). Для 2D культивирования клетки (4×10^3 /лунка), поддерживаемые в питательной среде, описанной выше, высевали на 96-луночные планшеты для выращивания тканей (Corning®, кат. № 3603) за день до обработки. Обработывали клетки соединением в течение 96 часов и затем анализировали их на жизнеспособность с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiterGlo® Luminescent Cell Viability Assay® (Promega, № G7572 для 2D) по инструкциям производителя на планшетриде EnVision™. Использовали кривую нелинейной регрессии и сигмоидальную кривую зависимости ответа от дозы для расчета полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) в программном обеспечении GraphPad Prism 4®.

Таблица 25

Антипролиферативная активность *in vitro* примеров 1, 34-36 в панели
опухолевых клеточных линий с мутацией G12C KRas

Клеточная линия	Пример 1		Пример 34		Пример 35		Пример 36	
	% ингиб. при 10 мкМ	IC50 (мкМ)	% ингиб. при 10 мкМ	IC50 (мкМ)	% ингиб. при 10 мкМ	IC50 (мкМ)	% ингиб. при 10 мкМ	IC50 (мкМ)
H358 (легкие)	94,5	0,004	95,6	0,002	96,4	0,002	89,1	0,008
SW1463 (толстая кишка)	95,3	0,006	90,1	0,004	94,3	0,005	82,7	0,014
MiaPaca-2 (поджелудочная железа)	77,2	0,018	82,9	0,01	85,8	0,011	79,6	0,081
H23 (легкие)	98,2	0,045	96,8	0,026	98	0,024	96,7	0,1
LU99 (легкие)	89,9	0,303	91,9	0,201	96,6	0,173	99,1	0,349
SW837 (прямая кишка)	60,8	0,25	59,6	0,2	64,2	0,33	58,7	0,57
HCC44 (легкие)	46,4	>10	41	>10	64,3	2,23	80,6	2,839
LXFA-983L (легкие)	78,6	3,609	68,8	>10	83,1	>10	88	>10
H2122 (легкие)	80,4	1,17	78,1	0,66	79,7	0,9	92,8	1,36
SW756 (шейка матки)	51,9	1,63	56,9	1,08	56,7	1,55	58,1	2,52
Calu-1 (легкие)	45,4	>10	50,6	1,14	56	0,48	77,4	2,925
H1792 (легкие)	63,6	3,011	56,7	4,354	81,7	1,41	97,4	2,032
UM-UC-3 (мочевой пузырь)	54,3	0,73	56,1	0,51	80,4	1,09	91,6	1,86
KYSE-410 (пищевод)	64,6	5,84	63,2	>10	68,3	7,974	43,1	>10
H1373 (легкие)	68,8	1,813	67,7	6,739	86,3	3,544	82,6	5,494
SW1573 (легкие)	35	>10	60,8	7,823	44,7	>10	54,3	9,35
H2030 (легкие)	32,9	>10	41,1	>10	40,3	>10	55,8	>10
A549 (легкие)	19,1	>10	18,8	>10	31,6	>10	62,1	9,5

Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения из примеров 1, 34-36 ингибируют рост многих опухолевых клеточных линий с мутацией G12C KRas, перечисленных в табл. 26.

В табл. 25 показано, что соединения из примеров 1, 34-36 демонстрируют антипролиферативную активность в большинстве опухолевых клеток с мутацией G12C KRas в условиях 2D выращивания культур. В клетках A549 с мутацией G12C KRas соединения из примеров 1, 34-36 демонстрируют слабую активность, что позволяет предположить, что примеры 1, 34-36 селективно ингибируют опухолевые клетки с мутацией G12C KRas.

Ингибированием фармакодинамических (ФД) маркеров G12C KRas в модели ксенотрансплантата

H358 и в модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы MiaPaca-2.

Цель данных анализов заключалась в оценке *in vivo* ингибирования мишени при пероральном введении экспериментального соединения. Клетки рака легких человек H358 или клетки рака поджелудочной железы MiaPaca-2 имплантировали самцам "голых" мышей с получением модели ксенотрансплантата опухоли. Клетки H358 или MiaPaca-2 (10×10^6 в 1:1 смеси Matrigel®, общий объем 0,2 мл) имплантировали посредством подкожной инъекции в заднюю лапу самок "голых" мышей (Harlan Laboratories). Для связывания с мишенью и ФД исследования использовали, в целом, 3-4 мыши в каждой группе. Лечение начинали с перорального введения (через зонд) экспериментального соединения или носителя (20% Captisol®, 25 мМ фосфат, pH 2,0 в 0,2 мл) по достижении размера опухоли приблизительно 300 мг.

Для *in vivo* ингибирования мишени и ФД анализа измельчали опухоли с помощью ступки и пестика на сухом льду и добавляли фрагменты опухоли в 800 мкл лизисного буфера, содержащего 1% Triton™ X-100, 25 мМ Tris с pH 7,5, 150 мМ хлорид натрия, 1 мМ ЭДТК и 1 мМ ЭГТК с коктейлем ингибитора протеазы и фосфатазы Halt (Thermo Scientific, кат. № 1861281) в пробирках Lysing Matrix D (MP Biomedical®, кат. № 6913-500) с одной дополнительной крупной гранулой (MP Biomedical® керамическая сферическая гранула размером 1/4 дюйма (0,64 см), кат. № 6540-412) на каждую пробирку. Фрагменты опухоли гомогенизировали на гомогенизаторе Thermo Bio101® Fast Prep (FP120) с настройкой 4 в течение 15 мин в холодном состоянии, всего 2 раза. Лизаты вращали при 14000 об./мин в течение 10 мин при 4°C для осветления. Определение белков осуществляли в надосадочном растворе лизата с помощью анализа белков BioRad Dc®, и разбавляли лизаты в полном лизисном/связывающем буфере из набора Ras GTPase Chemi ELISA Kit® (Active Motif, кат. № 52097). Иммуноферментный твердофазный анализ активного KRas проводили следующим образом: лунки для иммуноферментного твердофазного анализа, покрытые глутатионом, инкубировали с разбавленным RAF1-GST в полном лизисном/связывающем буфере в течение 1 ч при 4°C при слабом встряхивании. Лунки 3 раза промывали промывочным буфером и добавляли 100 мкг лизатов в каждую лунку, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при слабом встряхивании. Лунки промывали еще 3 раза, затем в каждую лунку добавляли первичное антитело, разбавленное в буфере для связывания антитела. Инкубировали планшеты в течение 1 ч. Лунки промывали еще 3 раза, затем в каждую лунку добавляли HRP-конъюгированное вторичное антитело, разбавленное в буфере для связывания антитела. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки для иммуноферментного твердофазного анализа промывали 4 раза, добавляли хемилюминесцентный реагент и затем считывали люминесценцию. Для иммуноферментного твердофазного анализа pERK с помощью Meso Scale Discovery использовали 25 мкл белка, содержащего 0,1% ДСН; набор для анализа цельного клеточного лизата Meso Scale Discovery для pERK приобретали у компании Meso Scale Discovery.

Дозозависимое ингибирование мишени *in vivo* и фармакодинамические эффекты в модели ксенотрансплантата рака легких H388.

Цель данного анализа заключалась в оценке дозозависимого ингибирования мишени *in vivo* и фармакодинамических эффектов в модели рака легких. Вводили экспериментальное соединение в мышиную модель ксенотрансплантата рака легких H358 в диапазоне доз от 12,5 до 100 мг/кг. Образцы опухоли собирали через 8 ч после введения однократной дозы. Получали лизаты опухоли и измеряли ингибирование pERK и активного KRas, как описано выше. Результаты представлены в табл. 26; соединение из примера 34 демонстрировало дозозависимое ингибирование pERK и активного KRas через 8 ч после введения однократной дозы от 12,5 до 100 мг/кг. Соединение из примера 35 также демонстрировало эффективное ингибирование pERK и активного KRas после однократного введения дозы от 12,5 до 100 мг/кг. Для указанных уровней доз наблюдали ингибирование pERK 82,2%-90,6% и ингибирование активного KRas 73,4%-94%.

Таблица 26

Дозозависимое ингибирование pERK, pMEK и активного KRas в мышинной модели ксенотрансплантата H358

Соединение	Доза (мг/кг)	Время	% ингибирование активного RAS	% ингибирование pERK
Носитель	0	8	0	0
Пример 35	12,5	8	81	82,2
	25	8	73,4	85,3
	50	8	94	90,6
	100	8	91,9	88,9
Пример 34	12,5	8	14,2	26,9
	25	8	35,1	53,2
	50	8	31,5	54
	100	8	69,3	74,8

In vivo ингибирование мишени в зависимости от времени и фармакодинамические эффекты в мышинной модели ксенотрансплантата рака легких H388.

Цель данного анализа заключалась в оценке in vivo ингибирования мишени в зависимости от времени и фармакодинамических эффектов в модели рака легких. В ходе эксперимента также вводили соединения из примеров 35 и 36 в дозе 30 мг/кг. После введения однократной дозы собирали образцы опухоли через 2, 4, 8, 12 и 24 ч после введения дозы. Получали лизаты опухоли и измеряли ингибирование pERK и активного KRas, как описано выше. Результаты представлены в табл. 27. Соединение из примера 35 демонстрировало ингибирование pERK и активного KRas, зависящее от времени, после введения однократной дозы 30 мг/кг. В дозе 30 мг/кг через 8 ч наблюдали ингибирование pERK 82,6%, а через 24 ч ингибирование pERK снизилось до 65,2%. Для активного KRas через 8 ч было достигнуто ингибирование 80,2%, а через 24 ч ингибирование активного KRas снизилось до 54,9%. Соединение из примера 36 также демонстрировало ингибирование pERK и активного KRas, зависящее от времени, после введения однократной дозы 30 мг/кг. В дозе 30 мг/кг через 8 ч наблюдали ингибирование pERK 82,6%, а через 24 ч ингибирование pERK снизилось до 48,8%. Для активного KRas через 8 ч было достигнуто ингибирование 88,5%, а через 24 ч ингибирование активного KRas снизилось до 43,2%.

Таблица 27

Ингибирование pERK и активного KRas в модели H358 в зависимости от времени.

Соединение	Доза (мг/кг)	Время (ч)	% ингибирование активного Ras	% ингибирование pERK
Носитель	0	4 или 8	0	0
Пример 35	30	2	7,6	67,9
	30	4	65,7	73,2
	30	8	80,2	82,6
	30	12	39,3	71,1
	30	24	54,9	65,2
Пример 36	30	2	72,6	79,7
	30	4	72,4	84,2
	30	8	88,5	86,9
	30	24	43,2	48,8

In vivo ингибирование мишени и фармакодинамические эффекты в мышинной модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы MiaPaca-2.

Цель данного анализа заключалась в оценке in vivo ингибирования мишени в зависимости от дозы и

времени и фармакодинамических эффектов в модели рака поджелудочной железы. В ходе эксперимента вводили соединение из примера 35 в дозе 5, 10 или 30 мг/кг. После введения однократной дозы собирали образцы опухоли через 2, 4, 8, 12 и 24 ч после введения дозы. Получали лизаты опухоли и измеряли ингибирование pERK и активного KRas, как описано выше. Результаты представлены в табл. 28. Соединение из примера 35 демонстрировало ингибирование pERK и активного KRas, зависящее от дозы и времени, после введения однократной дозы 5, 10 или 30 мг/кг. Для дозы 5 мг/кг через 4 ч наблюдали ингибирование активного Ras 63,8% и ингибирование pERK 50,9%. Для дозы 10 мг/кг через 4 ч наблюдали ингибирование активного Ras 85,5% и ингибирование pERK 58,5%. Для дозы 30 мг/кг через 4 ч наблюдали ингибирование активного Ras 90,9% и ингибирование pERK 58,7%, и через 24 ч сохранялось ингибирование активного Ras на уровне 60,7%.

Таблица 28

Ингибирование pERK и активного KRas в модели MiaPaca-2
в зависимости от дозы и времени.

Доза (мг/кг)	Время лечения (часы)	% ингибирование активного RAS	% ингибирование pERK
	4	0	0
5	2	24,3	51
5	4	63,8	50,9
5	8	57	59
5	12	34,3	47,4
5	24	4,3	-30,2
10	2	67,8	68,5
10	4	85,5	58,5
10	8	78,9	57,6
10	12	44,7	49
10	24	22,8	-14,9
30	2	76	59,5
30	4	90,9	58,7
30	8	89	54,3
30	12	68,9	58,4
30	24	60,7	15,6

Активность против роста опухоли в мышинной модели ксенотрансплантата рака легких H358.

Цель данного анализа заключалась в определении противоопухолевой активности экспериментальных соединений (пример 34, 35 и 36) в мышинной модели ксенотрансплантата рака легких H358. Клетки опухоли легких H358 (10×10^6) имплантировали посредством подкожной инъекции в заднюю лапу самок "голых" мышей (Taconic Biosciences). Для исследования эффективности использовали всего 4 мыши в каждой группе. Лечение начинали с перорального введения (через зонд) экспериментального соединения или носителя (20% Cartisol®, 25 мМ фосфат, pH 2,0 в объеме 0,2 мл) один или два раза в сутки в течение 28 дней, когда размер опухоли достигал приблизительно 300 мг. Для оценки безопасности и признаков токсичности контролировали рост опухоли и массу тела в зависимости от времени. Обобщенные результаты представлены в табл. 29. Для дозы 100 мг/кг, которую вводили по схеме один раз в сутки, для соединения из примера 34 наблюдали регрессию роста опухоли на уровне от -6,28 до -30,96%. Для дозы 30 мг/кг, которую вводили по схеме два раза в сутки, для соединения из примера 35 наблюдали регрессию опухоли на уровне от -67,68 до -72,14%. Для дозы 30 мг/кг, которую вводили по схеме два раза в сутки, для соединения из примера 36 была достигнута регрессия опухоли -68,96%. Не наблюдали существенной потери массы тела животных на протяжении всего исследования указанных соединений.

Таблица 29

Активность против роста опухоли в мышинной модели
ксенотрансплантата рака легких H358

Лечение	Доза (мг/кг)	Схема введения доз	% регрессии (12 день)	% регрессии (26 день)
Пример 35	30	PO, BID	-72,14	-67,68
Пример 36	30	PO, BID	-68,96	НД
Пример 34	100	PO, QD	-30,96	-6,28

Активность против роста опухоли в других моделях рака легких и в моделях рака толстой и прямой кишки, поджелудочной железы, мочевого пузыря и пищевода.

Помимо модели ксенотрансплантата H358, соединение из примера 35 испытывали в различных до-

зах в других моделях ксенотрансплантата или полученного у пациента ксенотрансплантата (PDX) рака легких, толстой и прямой кишок, поджелудочной железы, мочевого пузыря и пищевода. Для моделей ксенотрансплантата H1373, HCC44, MiaPaca-2, SW1463, KYSE-410 и UM-UC-3 обычно имплантировали $5-10 \times 10^6$ клеток в смеси 1:1 Matrigel (общий объем 0,2 мл) посредством подкожной инъекции в заднюю лапу "голых" мышей. Обычно для исследования эффективности использовали всего 4 мыши в каждой группе. Лечение начинали с перорального введения (через зонд) экспериментального соединения или носителя (20% Captisol, 25 мМ фосфат, pH 2,0) в объеме 0,2 мл, когда размер опухоли достигал приблизительно 200-300 мг. Для оценки безопасности и признаков токсичности контролировали рост опухоли и массу тела в зависимости от времени. Для модели PDX EL3187 оттаивали замороженные флаконы, содержащие фрагменты опухоли, при 37°C на водяной бане. Переносили фрагменты опухоли в пробирку фирмы Falcon объемом 50 мл и медленно добавляли в пробирку ледяную среду DMEM до общего объема 35 мл. Затем центрифугировали фрагменты опухоли при 130xg в течение 2 минут при 4°C и аспирировали надосадочный раствор. Описанную стадию промывания повторяли два раза и повторно суспендировали фрагменты опухоли в 10 мл DMEM для имплантации бестимусным "голым" мышам Foxnlnu (Envigo RMS, Inc., Маунт-Комфорт, штат Индиана). По достижении объема опухоли 800-100 мм³ усыпляли животных и собирали опухоли, используя асептическую технологию. Свежие опухоли разрезали на фрагменты размером 10-15 мм³ и помещали в холодную среду Gibco Hibernite. Фрагменты опухоли подкожно имплантировали животным с помощью троакарной иглы 10 калибра. По достижении размера опухоли 200-300 мм³ рандомизировали животных для лечения с применением соединения.

Активность соединения из примера 35 против роста опухоли или в отношении ее регрессии представлена в табл. 30. Среди моделей, перечисленных в табл. 31, EL3187 представляет собой модель ксенотрансплантата, полученного у пациента (PDX), а все остальные представляют собой модели ксенотрансплантата опухоли. Как показано в табл. 31, соединение из примера 35 демонстрирует дозозависимую противоопухолевую активность во всех моделях, что позволяет предположить, что соединение из примера 35 является активным против рака с мутацией G12C KRas, включая рак легких, толстой и прямой кишок, поджелудочной железы, мочевого пузыря и пищевода.

Таблица 30

Активность соединения из примера 35 против роста опухоли в моделях ксенотрансплантата или PDX рака легких, толстой и прямой кишок, поджелудочной железы, мочевого пузыря и пищевода.

Модель ксенотрансплантата / PDX (тип опухоли)	Ингибирование роста (%) или регрессия (-%) опухоли, вызванные соединением из примера 35										
	1 мг/кг		3 мг/кг		5 мг/кг		10 мг/кг		30 мг/кг		
	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28	
H1373 (легкие)					97,9	-	-	-	-49	49,7	
HCC44 (легкие)					28,3	57,5	32,7	61,8	77	84,1	
EL3187 (легкие)	52	89,2	39,8	-91				-96	-96		
MiaPaca-2 (поджелудочная железа)					81,7	-	-	-27	-45,2	-42	-43,6
SW1463					52,5	48,8	78,3	79,5	89,8	98,8	
(толстая и прямая кишка)											
SW837 (толстая и прямая кишка)					18,2	83,6	95,2	62,1	83,5	-23,8	
KYSE-410 (пищевод)								25,3	51,5	66,7	61,8
UM-UC-3 (мочевой пузырь)					34,3	45,3	33,6	75	83,1	85	

Эффективность комбинации соединения из примера 35 с другими прицельными терапевтическими агентами *in vitro*.

Помимо монотерапии, оценивали эффективность соединения из примера 35 в комбинации с другими прицельными терапевтическими агентами, такими как ингибитор CDK4 и CDK6 абемациклиб, низкомолекулярные ингибиторы EGFR эрлотиниб или афатиниб, моноклональное антитело-ингибитор EGFR цетуксимаб и ингибитор ERK LY3214996. Для данного исследования у ATCC приобретали одиннадцать клеточных линий и выращивали в условиях, рекомендованных ATCC. Все клеточные линии имели мутацию G12C KRAS и представляли собой шесть клеточных линий рака легких (H358, H1373,

H1792, H2030, H2122, SW1573 и HCC44), две клеточные линии колоректального рака (SW837 и SW1463), одну клеточную линию рака поджелудочной железы (MiaPaca-2) и одну клеточную линию рака пищевода (KYSE410). Анализ пролиферации проводили в формате 4-дневного анализа роста с использованием Cell TiterGlo® для считывания данных. Вкратце, клетки высевали на 96-луночные планшеты для клеточных культур и оставляли прикрепляться на ночь при 37°C. На следующий день клетки обрабатывали соединениями, которые использовали в качестве агентов монотерапии или в комбинациях. Сначала серийно разбавляли экспериментальные соединения в ДМСО, затем разбавляли в среде в 5X-концентрации с 1% ДМСО и, наконец, добавляли к клеткам в среде с получением 1X-разбавления. Инкубировали клетки при 37°C еще 4 дня. По окончании периода инкубации смешивали реагент Cell TiterGlo® и добавляли в лунки. Через 10 мин считывали люминесценцию на приборе Perkin Elmer Envision. С помощью 4-параметрической логистической модели получали абсолютные значения IC₅₀ для обработки одним агентом и для комбинированной обработки, затем определяли показатели аддитивности для каждой комбинированной обработки и клеточной линии. Комбинированные значения IC₅₀ корректировали на основании общей концентрации каждого соединения при совместном добавлении. (Пример: для соотношения концентраций соединения 1 и соединения 2 1:1 комбинированная IC₅₀ увеличивается в 2 раза.) Показатель аддитивности (CI) определяет степень, в которой эффективность комбинированной терапии отличается от ожидаемой аддитивной эффективности, и основан на определении аддитивности по Лоу:

$$CI = \frac{C_{A,y}}{IC_{A,y}} + \frac{C_{B,y}}{IC_{B,y}}$$

где

C_{A,y} и C_{B,y} представляют собой концентрации терапевтических агентов А и В, обеспечивающие эффект у при введении в комбинации;

IC_{A,y} и IC_{B,y} представляют собой концентрации А и В, обеспечивающие эффект у при введении по отдельности.

В некоторых случаях, если для расчета CI использовано ожидаемое значение IC₅₀, то рассчитанное значение CI называют показателем потенцирования. Биологическая интерпретация показателя аддитивности или потенцирования представлена ниже: синергетический, если показатель аддитивности или потенцирования <0,5, аддитивный, если показатель аддитивности или потенцирования составляет от 0,5 до 2, и антагонистический, если показатель аддитивности или потенцирования >2.

Как показано в табл. 31, комбинация соединения из примера 35 и абемациклиба имеет аддитивную или синергетическую эффективность в отношении ингибирования опухолевых клеток с мутацией G12C KRas. Среди одиннадцати испытанных клеточных линий аддитивный эффект наблюдали в пяти клеточных линиях с аддитивным индексом (CI) от 0,5 до 1,2, а синергетический эффект наблюдали в шести клеточных линиях с CI<0,5, что позволяет предположить, что комбинация соединения из примера 35 и абемациклиба может обеспечивать преимущество для онкологических пациентов с мутацией G12C KRas.

Таблица 31

In vitro комбинация соединения из примера 35 и ингибитора CDK4/CDK6 абемациклиба

Название клеточной линии	Соединение	IC ₅₀ соединения (мкМ)	IC ₅₀ примера 35 (мкМ)	Общая IC ₅₀ (мкМ)	Показатель аддитивности или потенцирования
SW1463	Абемациклиб	0,16253	0,001089422	0,001861309	0,859990152
SW837	Абемациклиб	3,2175	0,413147553	0,276563347	0,377680849
H358	Абемациклиб	0,47697	0,003199233	0,006847357	1,077334012
HCC44	Абемациклиб	3,64845	1,764025208	2,86634865	1,205263179
NCI-H1373	Абемациклиб	4,27817	0,403993227	0,11698021	0,158451664
NCI-H1792	Абемациклиб	0,40097	0,118134759	0,041106255	0,225239313
NCI-H2030	Абемациклиб	1,81728	0,819557983	0,357361105	0,316343687
NCI-H2122	Абемациклиб	0,32737	0,031200861	0,02784263	0,488708133
SW1573	Абемациклиб	0,35607	10,7632	0,614058717	0,890789114
KYSE-410	Абемациклиб	1,94423	4,89618484	0,773507455	0,277914318
MIAPACA2	Абемациклиб	0,28033	0,00748134	0,01060427	0,727628496

Как показано в табл. 32, комбинация соединения из примера 35 и низкомолекулярного ингибитора EGFR эрлотиниба или афатиниба имеет аддитивный или синергетический эффект в отношении ингибирования опухолевых клеток, несущих мутацию G12C KRas. Для комбинации с эрлотинибом, среди одиннадцати испытанных клеточных линий аддитивный эффект наблюдали в пяти клеточных линиях с показателем аддитивности или потенцирования от 0,5 до 1,15, а синергетический эффект наблюдали в шести клеточных линиях с показателем аддитивности или потенцирования <0,5. Для комбинации с афатинибом, среди девяти испытанных клеточных линий аддитивный эффект наблюдали в четырех клеточных линиях со значением CI от 0,5 до 1,1, а синергетический эффект наблюдали в пяти клеточных линиях с

CI <0,5. Полученные данные позволяют предположить, что комбинация примера 35 и низкомолекулярного ингибитора EGFR может обеспечивать преимущество для онкологических пациентов с мутацией G12C KRas.

Таблица 32

In vitro комбинация соединения из примера 35 и низкомолекулярного ингибитора EGFR эрлотиниба или афатиниба

Название клеточной линии	Соединение	IC50 соединения (мкМ)	IC50 примера 35 (мкМ)	Общая IC50 (мкМ)	Показатель аддитивности или потенцирования
SW1463	Эрлотиниб	0,40193	0,001089	0,002231	1,026498376
SW837	Эрлотиниб	>10	0,413148	0,140876	0,170491111
H358	Эрлотиниб	2,19247	0,003199	0,007357	1,151488525
HCC44	Эрлотиниб	>10	1,764025	1,567802	0,444381951
NCI-H1373	Эрлотиниб	>10	0,403993	0,411429	0,509203323
NCI-H1792	Эрлотиниб	>10	0,118135	0,090106	0,381370715
NCI-H2030	Эрлотиниб	>10	0,819558	0,424816	0,259174125
NCI-H2122	Эрлотиниб	12,1511	0,031201	0,030705	0,493309984
SW1573	Эрлотиниб	>10	10,7632	11,32891	0,526279729
KYSE-410	Эрлотиниб	>10	4,896185	1,153993	0,11784619
MIAPACA2	Эрлотиниб	>10	0,007481	0,015373	1,027399401
Название клеточной линии	Соединение	IC50 соединения (мкМ)	IC50 примера 35 (мкМ)	Общая IC50 (мкМ)	Показатель аддитивности или потенцирования
SW1463	Афатиниб	0,05612	0,003248	0,003838	0,625028705
SW837	Афатиниб	1,28333	0,321329	0,06905	0,134347371
H358	Афатиниб	0,30551	0,002231	0,004945	1,11655131
NCI-H1373	Афатиниб	2,21668	0,255708	0,090101	0,196502052
NCI-H1792	Афатиниб	3,39177	0,903764	0,2928	0,205152445
NCI-H2122	Афатиниб	1,45096	0,03372	0,019501	0,295874375
SW1573	Афатиниб	1,58254	12,736	2,456936	0,872720042
KYSE-410	Афатиниб	0,65031	4,058337	0,041564	0,03707842
MIAPACA2	Афатиниб	1,94391	0,005951	0,011389	0,959906159

Как показано в табл. 33, комбинация соединения из примера 35 и антитела к EGFR цетуксимаба имеет аддитивную или синергетическую эффективность в отношении ингибирования опухолевых клеток с мутацией G12C KRas. Среди одиннадцати испытанных клеточных линий пять клеточных линий продемонстрировали аддитивный эффект с показателем потенцирования (CI) от 0,5 до 1,06, и шесть клеточных линий продемонстрировали синергетический эффект с показателем потенцирования <0,5, что позволяет предположить, что комбинация примера 35 и цетуксимаба может обеспечивать преимущество для онкологических пациентов с мутацией G12C KRas.

Таблица 33

In vitro комбинация примера 35 и антитела к EGFR цетуксимаба

Название клеточной линии	Соединение	IC50 соединения (мкМ)	IC50 примера 35 (мкМ)	Общая IC50 (мкМ)	Показатель потенцирования
SW1463	Цетуксимаб	>20	0,001089422	<0,00152	<0,4663
SW837	Цетуксимаб	>20	0,413147553	0,059912256	0,048338062
H358	Цетуксимаб	>20	0,003199233	0,004884468	0,508920734
HCC44	Цетуксимаб	>20	1,764025208	5,643865533	1,066474845
NCI-H1373	Цетуксимаб	>20	0,403993227	0,433760358	0,357894084
NCI-H1792	Цетуксимаб	>20	0,118134759	0,054252171	0,153079899
NCI-H2030	Цетуксимаб	>20	0,819557983	2,161595154	0,879171131
NCI-H2122	Цетуксимаб	>20	0,031200861	0,021630045	0,23108385
SW1573	Цетуксимаб	>20	10,7632	23,86318501	0,739036253
KYSE-410	Цетуксимаб	>20	4,89618484	1,117690734	0,076092629
MIAPACA2	Цетуксимаб	>20	0,00748134	0,018187633	0,810355342

Как показано в табл. 34, комбинация соединения из примера 35 и ингибитора ERK LY3219446 имеет аддитивную или синергетическую эффективность в отношении ингибирования опухолевых клеток с мутацией G12C KRas. Среди десяти испытанных клеточных линий аддитивный эффект наблюдали в 5

клеточных линиях со значением CI от 0,5 до 1,2, а синергетический эффект наблюдали в 5 клеточных линиях с показателем аддитивности или потенцирования <0,5, что позволяет предположить, что комбинация примера 35 и ингибитора ERK может обеспечивать преимущество для онкологических пациентов с мутацией G12C KRas.

Таблица 34

In vitro комбинация соединения из примера 35 и ингибитора ERK LY3214996

Название клеточной линии	Соединение	IC50 соединения (мкМ)	IC50 примера 35 (мкМ)	Общая IC50 (мкМ)	Показатель аддитивности или потенцирования
SW1463	LY3214996	0,42099	0,001089	0,001225	0,563579
SW837	LY3214996	3,4288	0,413148	0,149674	0,202965
H358	LY3214996	1,67124	0,001854	0,004485	1,210955
HCC44	LY3214996	3,26824	1,764025	1,988401	0,867799
NCI-H1373	LY3214996	9,2603	0,403993	0,304663	0,393514
NCI-H1792	LY3214996	3,51533	0,862901	1,310947	0,946077
NCI-H2122	LY3214996	1,60091	0,108719	0,068988	0,338821
SW1573	LY3214996	>10	10,7632	8,05786	0,374325
KYSE-410	LY3214996	4,59338	4,896185	2,178332	0,459569
MIAPACA2	LY3214996	0,8405	0,00628	0,014545	1,166658

Эффективность комбинации соединения из примера 35 с химиотерапевтическими агентами in vitro.

Соединение из примера 35 также комбинировали с химиотерапией, включая пеметрексед, карбоплатин или цисплатин, в трех клеточных линиях рака легких, H1792, H358 и H2122, in vitro. Как показано в табл. 35, для комбинации с пеметрекседом наблюдали аддитивный или синергетический эффект, на основании CI. Аналогичные аддитивные эффекты наблюдали для комбинаций с карбоплатином и цисплатином.

Таблица 35

In vitro комбинация соединения из примера 35 и химиотерапевтических агентов (показатель аддитивности)

Клеточные линии	NCI-H1792	NCI-H358	NCI-H2122
ABS_IC50_Пример 35 (мкМ)	0,8399	0,001	0,209
ABS_IC50_пеметрексед (мкМ)	20	20	0,003739
ABS_IC50_общая (мкМ)	1,305	0,001	0,000084
Показатель аддитивности	0,809	0,5	0,011
ABS_IC50_карбоплатин (мкМ)	20	20	20
ABS_IC50_общая (мкМ)	2,6	0,001	0,0363
Показатель аддитивности	1,616	0,5	0,087
ABS_IC50_цисплатин (мкМ)	0,312	0,773	1,163
ABS_IC50_общая (мкМ)	0,134	0,001	0,15
Показатель аддитивности	0,296	0,5	0,422

In vivo эффективность комбинации примера 35 с другими прицельными терапевтическими агентами.

Соединение из примера 35 оценивали в комбинации с ингибитором CDK4/CDK6 абемациклибом, низкомолекулярными ингибиторами EGFR эрлотинибом или афатинибом, моноклональным анти-EGFR антителом цетуксимабом или ингибитором ERK LY3214996, в животной модели PDX. Использовали, в целом, шесть in vivo моделей ксенотрансплантата или PDX - четыре модели рака легких (H358, H1373, LU99 и EL3187 PDX), одну модель колоректального рака (SW1463) и одну модель рака поджелудочной железы (Mia-Paca-2). В табл. 26 представлены результаты всех указанных исследований комбинаций in vivo.

Во всех шести моделях изучали комбинацию соединения из примера 35 и ингибитора CDK4/6 абемациклиба. Во всех шести моделях указанная комбинация показала лучшие результаты, чем соединение из примера 35 или абемациклиб по отдельности. В четырех моделях рака легких и в одной модели рака поджелудочной железы для указанной комбинации наблюдали синергию и существенную регрессию роста опухоли. В модели колоректального рака SW1463 наблюдали лучшую противоопухолевую активность, чем для соединения примера 35 или абемациклиба по отдельности.

Во всех шести моделях изучали комбинацию соединения из примера 35 и низкомолекулярного ингибитора EGFR эрлотиниба. Во всех шести моделях указанная комбинация показала лучшие результаты, чем соединение из примера 35 или эрлотиниб по отдельности. В трех моделях рака легких и в одной модели рака поджелудочной железы для указанной комбинации наблюдали синергию и существенную регрессию роста опухоли.

рессию роста опухоли. В модели колоректального рака SW1463 и в модели рака легких LU99 указанная комбинация демонстрировала лучшие результаты, чем соединение из примера 35 или эрлотиниб по отдельности. В модели ксенотрансплантата рака легких H358 наблюдали аддитивный эффект и лучшую противоопухолевую активность комбинации соединения из примера 3 и низкомолекулярного ингибитора EGFR афатиниба, по сравнению с указанными соединениями по отдельности.

In vivo исследования комбинации примера 35 и антитела EGFR цетуксимаба проводили в модели ксенотрансплантата рака легких H358 и в модели ксенотрансплантата колоректального рака SW1463. В обеих моделях наблюдали регрессию роста опухоли и лучшую комбинированную эффективность для указанной комбинации. Указанная комбинация продемонстрировала лучшие результаты, чем соединение из примера 35 или цетуксимаб по отдельности.

Во всех шести моделях исследовали комбинацию соединения из примера 35 и ингибитора ERK (ERKi) LY3214996. Во всех шести моделях для указанной комбинации наблюдали синергию или аддитивный эффект, и указанная комбинация показала лучшие результаты, чем соединение из примера 35 или ингибитор ERK по отдельности. В трех моделях рака легких (H358, H1373 и EL3187), в одной модели рака поджелудочной железы и в одной модели колоректального рака наблюдали существенную регрессию роста опухоли.

Таблица 36

In vivo противоопухолевая активность соединения из примера 35 в комбинации с другими прицельными терапевтическими агентами в моделях ксенотрансплантата опухоли или в моделях PDX

Лечение	Доза (мг/кг)	Доза	Ингибирование роста (%) и регрессия (-%) опухоли в моделях ксенотрансплантата или в моделях PDX							
			H358 (легкие)		H1373 (легкие)	EL3187 (легкие, PDX)	Mia Раса-2 (поджелудочная железа)	SW1463 (толстая и прямая кишка)		LU99 (легкие)
Пример 35	3	QDx28	-	-	-	85,2	-	-	-	-
	10	QDx28	74,9	46,6	98,5		-27	44	68,7	
	30	QDx28	-	-	-	-	-	-	-	76,2
ERKi	100	QDx28	71,1	-	85,2	85,4	46,5	-	92,7	28,6
абемациклиб	50	QDx28	77	-	77,6	41,3	45,1	53	-	(-21,5)*
эрлотиниб	25	QDx28	76,9	-	50,6	29,5	(-77,7)*	40,9		(-23,1)*
цетуксимаб	20	QDx28	-	87	-	-	-	97,9	94,7	-
афатиниб	25	QDx28	-	77,4	-	-	-	-	-	-
Пример 35 + ERKi	10+100	-	-22,1	-	-70,2	-83,3	-65,4		-24,8	-3,7
Пример 35 + абемациклиб	10+50	-	-61,8	-	-54,4	-96	-59,8	81	-	-37,4
Пример 35 + эрлотиниб	10+25	-	-64	-	-48,9	-89,9	-62,2	88	-	98,9
Пример 35 + цетуксимаб	30+20	-		-34,6	-	-	-	-20,2	-42,8	-
Пример 35 + афатиниб	10+25	-		91,3	-	-	-	-	-	-

* Означает, что средний объем опухоли был больше, чем в контрольной группе с носителем.

Эффективность в комбинации с иммунотерапевтическими агентами, анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителом.

Использовали мышиную сингенную модель для оценки эффекта комбинации ингибирования G12C KRas и иммунотерапии. В данной модели преобразовывали мутацию G12D KRas в мутацию G12C KRas с помощью нокина CRISPR в клеточную линию CT-26, которая представляет собой клеточную линию колоректальной опухоли мышей. Нокин G12C KRas подтверждали с помощью генетической и функциональной характеристики. Сконструированную клеточную линию называли CT-26-H4/KRas G12C. Полученные клетки имплантировали мышам Balb/c и начинали лечение предложенным соединением через 6 дней после имплантации опухолевых клеток. В данном исследовании комбинировали соединение из примера 35 с анти-PD-L1 антителом (RMP1 (BioXcell, кат. № BE0146)) или с анти-PD-1 антителом (Holmgaard RB, et al., J. Immunotherapy Cancer 2018] 6(47): 1-15), используя схему введения доз, указанную в табл. 37. Как показано в табл. 37, соединение из примера 35 продемонстрировало существенную активность в качестве агента монотерапии, со средним ингибированием роста опухоли 89,4% и без полного ответа в дозе 30 мг/кг по окончании 3-недельного введения доз. Анти-мышинное антитело PD-L1 178G7 показало ингибирование роста опухоли на уровне 36,1%, без полного ответа, а анти-PD-1 антитело RMP1 показало ингибирование роста опухоли на уровне 70,7% и 10% (1 из 10) полных ответов по окончании введения доз (на 21 день) или на 59 день. Однако комбинация соединения из примера 35 с антителом анти-PD-L1 или с анти-PD-1 обеспечивала достижение существенно более высокой противо-

опухолевой активности. По окончании 3-недельного введения доз комбинации соединения из примера 35 с антителом анти-PD-L1 или анти-PD-1 продемонстрировала регрессию опухоли на уровне -33,9% и -19,4%, а также 30% и 40% полных ответов, соответственно. Через 3 недели прекращали лечение с применением соединения, и все опухоли в группах монотерапии, за исключением 1 животного в группе с анти-PD-1, снова начинали расти. Однако многие опухоли в двух группах с применением комбинированного лечения не демонстрировали признаков возобновления роста. Через 38 дней после введения последней дозы (на 59 день) в группах с применением комбинированного лечения наблюдали 40% и 60% полных ответов, что свидетельствует о том, что многие опухоли в группах с применением комбинированного лечения были устранены. Полученные результаты позволяют предположить, что лечение соединением из примера 35 в комбинации с антителом анти-PD-L1 или анти-PD-1, может быть преимуществом для онкологических пациентов с мутацией G12C KRas.

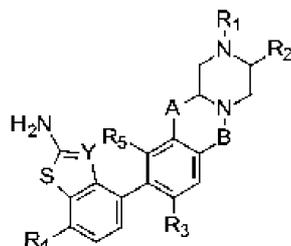
Таблица 37

In vivo противоопухолевая активность соединения из примера 35 в комбинации с иммунотерапией (с антителом анти-PD-1 или анти-PD-L1) в сингенной модели CT-26-H4/KRasG12C

Лечение	Доза	Частота введения доз	Ингибирование роста опухоли (T/C) (%)	% регрессии	Полная регрессия (21 день)	Полная регрессия (59 день)
Носитель		PO, QDx21	-	-	0/10	0/10
Пример 35	30 мг/кг	PO, QDx21	89,4 (11,6)	-	0/10	0/10
Антитело PD-L1 (178G7)	500 мкг/мышь	IP, Q7Dx3	36,1 (63,9)	-	0/10	0/10
Антитело PD-1 (RMP1-14)	250 мкг/мышь	IP, BIWx3	-70,7 (29,3)	-	1/10	1/10
Пример 35 + антитело PD-L1 (178G7)	30 мг/кг	PO, QDx21	-	-33,9	3/10	4/10
	500 мкг/мышь	IP, Q7Dx3				
Пример 35 + антитело PD-1 (RMP1-14)	30 мг/кг	PO, QDx21	-	-19,4	4/10	6/10
	250 мкг/мышь	IP, BIWx3				

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



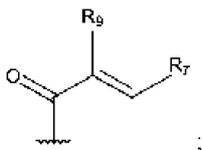
где

A представляет собой -OCH₂-, -OCH₂CH₂- или -CH₂OCH₂-;

B представляет собой -CH₂- или -C(O)-;

Y представляет собой -C(CN)- или -N-;

R1 представляет собой -CN, -C(O)C≡CR₈ или группу формулы



R_2 представляет собой H или метил;

R_3 и R_5 , каждый независимо, представляют собой H, галоген или $-C_{1-6}$ алкил;

R_4 представляет собой H или галоген;

R_7 представляет собой H, галоген, $-NR_{11}R_{12}$, $-CH_2NR_{11}R_{12}$, $-C_{1-6}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} или R_{13} , $-C_{0-3}$ алкил-циклопропил или $-O-C_{1-6}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} или R_{13} ;

R_8 представляет собой H, $-C_{1-4}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} , или $-C_{3-6}$ циклоалкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} ;

R_9 представляет собой H, галоген, $-CN$, $-C_{0-3}$ алкил- C_{3-6} циклоалкил или $-C_{1-6}$ алкил, необязательно замещенный 1-3 группами R_{10} ;

R_{10} в каждом случае независимо представляет собой галоген, гидрокси, $-C_{1-4}$ алкил или $-O-C_{1-4}$ алкил;

R_{11} и R_{12} , каждый независимо, представляют собой H, $-C_{1-4}$ алкил или $-C_{1-4}$ гетероалкил, причем R_{11} и R_{12} могут объединяться с атомом азота, к которому они присоединены, с образованием C_{3-6} циклогетероалкила; и

R_{13} в каждом случае независимо представляет собой $-NH-C_{1-4}$ алкил;

или его фармацевтически приемлемая соль.

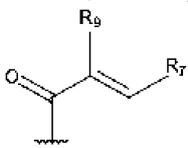
2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что А представляет собой $-OCH_2CH_2-$, или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что В представляет собой $-C(O)-$, или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что Y представляет собой $-C(CN)-$, или его фармацевтически приемлемая соль.

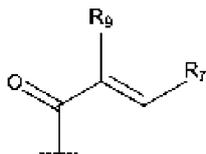
5. Соединение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что Y представляет собой $-N-$, или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Соединение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что R_1 представляет собой группу формулы



и при этом R_7 представляет собой H, F, Cl, метил, этокси, этил, изопропил или циклопропил, или его фармацевтически приемлемая соль.

7. Соединение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что R_1 представляет собой группу формулы



и при этом R_9 представляет собой H, F, Cl, $-CHF_2$, $-CF_3$ или $-CH_2OH$, или его фармацевтически приемлемая соль.

8. Соединение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что R_1 представляет собой $-CN-$, $-C(O)C\equiv CR_8$, или его фармацевтически приемлемая соль.

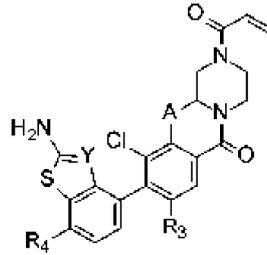
9. Соединение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что R_2 представляет собой H или метил, или его фармацевтически приемлемая соль.

10. Соединение по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что R_3 представляет собой H, F, Cl, метил, этил, изопропил, или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Соединение по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что R_4 представляет собой H, F или Cl, или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Соединение по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что R_5 представляет собой H, или его фармацевтически приемлемая соль.

13. Соединение по п.1 формулы



где

A представляет собой $-OCH_2-$ или $-OCH_2CH_2-$;

Y представляет собой C(CN) или N;

R₃ представляет собой Cl или F;

R₄ представляет собой H или F, если Y представляет собой C(CN); и

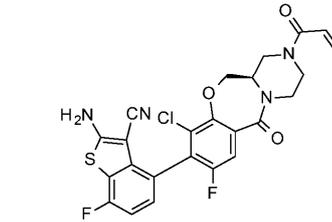
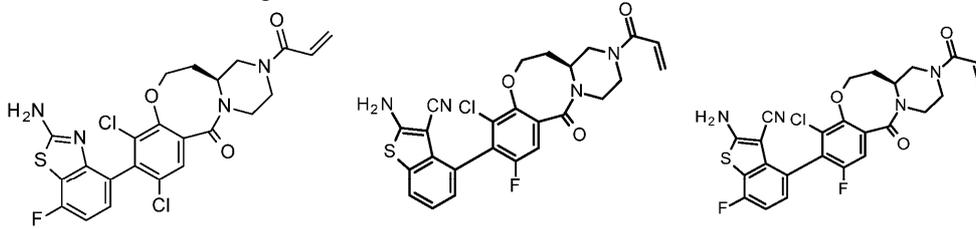
R₄ представляет собой F, если Y представляет собой N,

или его фармацевтически приемлемая соль.

14. Соединение по п.13, отличающееся тем, что A представляет собой



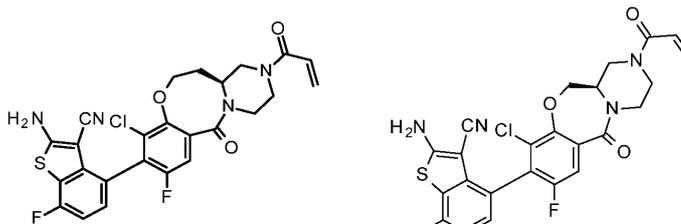
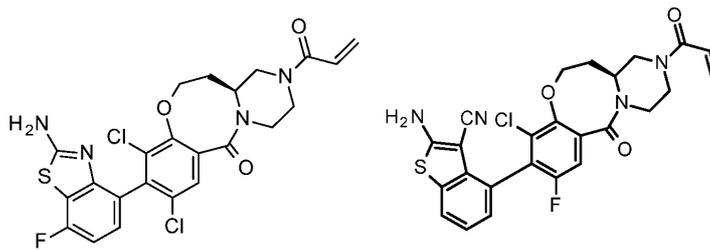
15. Соединение по п.1, выбранное из



или

или его фармацевтически приемлемая соль.

16. Соединение по п.15, которое представляет собой



или

17. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-16 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

18. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эф-

эффективного количества фармацевтической композиции по п.17, причем рак выбран из рака легкого, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака пищевода, эндометриального рака, рака яичника, холангиокарциномы и колоректального рака.

19. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по любому из пп.1-16 или его фармацевтически приемлемой соли, причем рак выбран из рака легкого, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака пищевода, эндометриального рака, рака яичника, холангиокарциномы и колоректального рака.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, и при этом одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas.

21. Способ по п.19, отличающийся тем, что рак представляет собой колоректальный рак, и при этом одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas.

22. Способ по п.19, отличающийся тем, что рак представляет собой рак поджелудочной железы, и при этом одна или более клеток экспрессируют мутантный белок G12C KRas.

23. Способ по п.19, отличающийся тем, что пациент болен раком, который, как было установлено, имеет одну или более клеток, экспрессирующих мутантный белок G12C KRas, до введения предложенного соединения или его фармацевтически приемлемой соли.

24. Способ лечения онкологического пациента, имеющего мутацию G12C KRas, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения в по любому из пп.1-16 или его фармацевтически приемлемой соли.

25. Способ по любому из пп.19-24, отличающийся тем, что пациенту также вводят эффективное количество одного или более из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1, ингибитора CD4/CDK6 или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора EGFR или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора ERK или его фармацевтически приемлемой соли, агента на основе платины и пеметрекседа или его фармацевтически приемлемой соли.

26. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-16 для лечения рака.

27. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-16 для производства лекарственного средства для лечения рака.

28. Применение по п.26 или 27, отличающееся тем, что рак выбран из рака легкого, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака пищевода, эндометриального рака, рака яичника, холангиокарциномы и колоректального рака.

29. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-16 в комбинации для одновременного, отдельного или последовательного введения с одним или более из ингибитора PD-1 или PD-L1, ингибитора CD4/CDK6 или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора EGFR или его фармацевтически приемлемой соли, ингибитора ERK или его фармацевтически приемлемой соли, агента на основе платины и пеметрекседа или его фармацевтически приемлемой соли, для лечения рака.

