



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128806** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)**C07D 487/04** (2006.01)**C07D 498/04** (2006.01)**A61K 31/553** (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

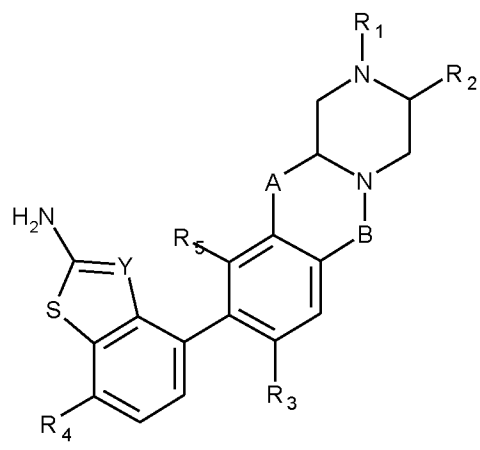
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2022 01784	(72) Винахідник(и): Буле Серж Луїс (US), Фотнер Кевін Чарлз (US), Гуо Декі (US), Хайман Девід Майкл (US), Пен Шен-Бін (US), Сі Чонг (US)
(22) Дата подання заявки: 04.12.2020	(73) Володілець (володільці): ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 24.10.2024	(74) Представник: Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 62/946,586	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2020/178282 A1, 10.09.2020 WO 2018/206539 A1, 15.11.2018 WO 2019/215203 A1, 14.11.2019 US 2009318412 A1, 24.12.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 11.12.2019	
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 17.08.2022, Бюл.№ 33	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 23.10.2024, Бюл.№ 43	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2020/063272, 04.12.2020	

(54) ІНГІБІТОРИ KRAS G12C**(57) Реферат:**

Цим винаходом надані сполуки формули I:

UA 128806 C2



де R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, A, B та Y розкриті у цьому описі, їх фармацевтично прийнятні солі та способи застосування цих сполук і солей для лікування хворих на рак.

Цей винахід стосується нових трициклічних гетероциклічних сполук та їх фармацевтично прийнятних солей, фармацевтичних композицій, які містять згадані трициклічні гетероциклічні сполуки та солі, і способів застосування згаданих сполук і солей для лікування ракових захворювань, таких як рак легенів, колоректальний рак, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, рак шийки матки, рак ендометрія, рак яєчників, холангіокарцинома або рак стравоходу.

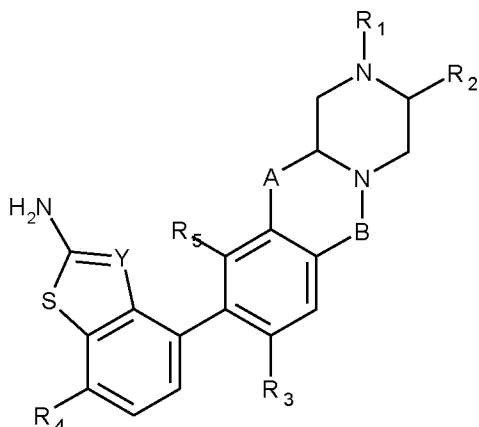
Сигнальний шлях MAPK/ERK передає позаклітинні стимули до ядра, таким чином регулюючи різноманітні клітинні реакції, включаючи клітинну проліферацію, диференціацію та апоптоз. Білок KRas є ініціатором сигнального шляху MAPK/ERK і функціонує як перемикач, відповідальний за спричинення поділу клітин. У неактивному стані KRas зв'язує гуанозиндифосфат (GDP), ефективно посилюючи негативний сигнал для пригнічення поділу клітин. У відповідь на позаклітинний сигнал KRas алостерично активується, що забезпечує нуклеотидний обмін GDP на гуанозинтрифосфат (GTP). У своєму активному стані, зв'язаному з GTP, KRas залучає та активує білки, необхідні для поширення сигналізації, спричиненої фактором росту, а також інших сигнальних рецепторів клітини. Прикладами білків, залучених KRas-GTP, є c-Raf і PI3-кіназа. KRas, як GTP-аза, перетворює зв'язаний GTP назад на GDP, таким чином повертаючись у неактивний стан і знову поширюючи сигнали для пригнічення поділу клітин. Функціональні мутації посилення KRas демонструють підвищений ступінь зв'язування GTP і знижену здатність перетворювати GTP на GDP. Результатом є посилення сигналу MAPK/ERK, що сприяє росту ракових клітин. Міссенс-мутації KRas на кодоні 12 є найпоширенішими мутаціями та помітно знижують активність GTP-ази.

Онкогенні мутації KRas були ідентифіковані в приблизно 30% випадків раку людини, і було продемонстровано, що вони активують численні низхідні сигнальні шляхи. Незважаючи на поширеність мутацій KRas, це була важка терапевтична мішень. (Cox, A.D. Drugging the Undruggable RAS: Mission Possible? Nat. Rev. Drug Disc. 2014, 13, 828-851; Pylayeva-Gupta, Yu., et al. RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web. Nat. Rev. Cancer 2011, 11, 761-774).

У WO2015/054572 та WO2016/164675 розкриті певні похідні хіназоліну, здатні зв'язуватись з KRas G12C. У WO2016/044772 також розкриті способи застосування таких похідних хіназоліну. У WO2020/0081282 розкриті інгібітори KRas G12C. У WO2018/206539 та WO2020/178282 розкриті певні гетероарильні сполуки, здатні зв'язуватись з білками KRas G12C RAS.

Залишається потреба у наданні альтернативних дрібномолекулярних інгібіторів KRas. Зокрема, існує потреба в наданні більш сильнодіяних пероральних інгібіторів KRas, придатних для лікування раку. Більш конкретно, існує потреба в наданні дрібномолекулярних інгібіторів KRas, які специфічно інгібують активність KRas GTP. Також існує потреба в наданні дрібномолекулярних інгібіторів KRas, які демонструють більшу ефективність відносно KRas GTP або знижену інгібіторну активність щодо KRas. Існує також бажання створення інгібіторів KRas, які демонструють кращі фармакокінетичні/фармакодинамічні властивості. Крім того, існує потреба в наданні більш потужних інгібіторів KRas, які демонструють підвищену ефективність зі зменшенням або мінімізацією несприятливих або небажаних ефектів. Цей винахід задовольняє одну або декілька з цих потреб шляхом надання нових інгібіторів KRas.

Цим винаходом надана сполука Формули I



, Формула I

або її фармацевтично прийнятна сіль, де:

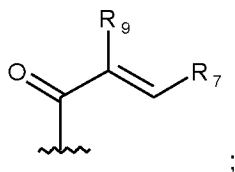
А являє собою -OCH₂-, -N(R₆)CH₂-, -OCH₂CH₂-, -N(R₆)CH₂CH₂-, -CH₂OCH₂- або -CH₂N(R₆)CH₂-

;

В являє собою -CH₂- або -C(O)-;

Y являє собою -C(CN)- або -N-;

R₁ являє собою -CN, -C(O)OC≡R₈ або групу формули



5

R₂ являє собою H, метил або -CH₂CN;

кожен з-посеред R₃ та R₅ незалежно являє собою H, галоген, -C₀₋₃-алкілциклопропіл, -C₁₋₆-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀, або -O-C₁₋₆-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀;

10 R₄ являє собою H, галоген або -C₁₋₆-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀;

R₆ являє собою H або -C₁₋₆-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀;

15 R₇ являє собою H, галоген, -NR₁₁R₁₂, -CH₂NR₁₁R₁₂, -C₁₋₆-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀ або R₁₃, -C₀₋₃-алкілциклопропіл, або -O-C₁₋₆-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀ або R₁₁;

R₈ являє собою H, -C₁₋₄-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀, або -C₃₋₆-циклоалкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀;

R₉ являє собою H, галоген, -CN, -C₀₋₃-алкіл-C₃₋₆-циклоалкіл, або -C₁₋₆-алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R₁₀;

20 R₁₀ у кожному разі незалежно являє собою галоген, кисень, гідроксигрупу, -C₁₋₄-алкіл або -O-C₁₋₄-алкіл;

кожен з-посеред R₁₁ та R₁₂ незалежно являє собою H, -C₁₋₄-алкіл, або -C₁₋₄-гетероалкіл, де R₁₁ та R₁₂ можуть бути об'єднані для одержання гетероциклоалкілу; та

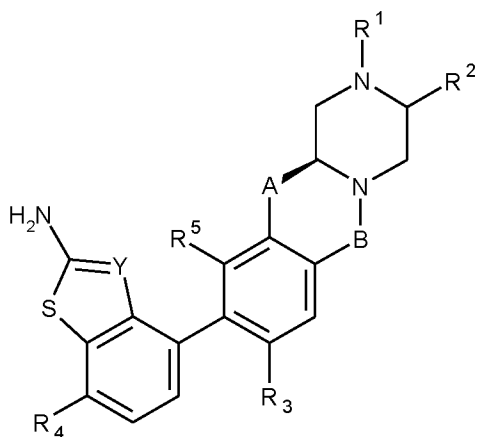
R₁₃ у кожному разі незалежно являє собою -N-C₁₋₄-алкіл.

25 У значенні, вживаному у цьому описі, термін галоген означає фтор (F), хлор (Cl), бром (Br) або йод (I). У значенні, вживаному у цьому описі, термін алкіл означає насичені лінійні або розгалужені одновалентні вуглеводневі радикали, які містять від одного до шести атомів вуглецю, наприклад, "-C₁₋₆-алкіл". До прикладів алкілів належать, але без обмеження ними, метил, етил, пропіл, 1-пропіл, ізопропіл, бутіл, пентил і гексил. У значенні, вживаному у цьому описі, термін гетероалкіл означає насичені лінійні або розгалужені одновалентні вуглеводневі радикали, які містять від двох до п'яти атомів вуглецю і щонайменше один гетероатом, наприклад, "-C₁₋₄-гетероалкіл". У значенні, вживаному у цьому описі, термін циклоалкіл означає насичені одновалентні циклічні молекули з трьома-шістьма атомами вуглецю, наприклад, "-C₃₋₆-циклоалкіл". До прикладів циклоалкільних груп належать, але без обмеження ними, циклопропіл, циклобутил, циклопентил і циклогексил. У значенні, вживаному у цьому описі, термін циклогетероалкіл означає насичені одновалентні циклічні молекули з двома-п'ятьма атомами вуглецю і щонайменше одним гетероатомом, наприклад, "-C₃₋₆-циклогетероалкіл". Приклади циклогетероалкільних груп включають, але без обмеження ними, піролідін, піперидин, імідазолідін, піразолідін та піперазин.

40 У випадках, коли вказаний нуль, наприклад, -C₀₋₃-алкіл-C₃₋₆-циклоалкіл, алкільний компонент замісної групи може бути відсутнім, таким чином, якщо R₉ Формули I являє собою циклопропілну групу без алкільного компонента, замісник буде описаний як -C₀₋₃-алкілциклопропільний замісник, як описано для R₉ (тобто замісною групою буде -C₀-циклопропіл).

45 Стосовно R₁₁ і R₁₂, дві згадані групи можуть бути поєднані з азотом, до якого вони приєднані, коли хімія дозволяє утворювати гетероциклоалкіл. До прикладів згаданих гетероциклоалкільних груп, але без обмеження ними, належать піперидин, піперазин і морфолін.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули Ia



, Формула Ia

де R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, A, B і Y відповідають визначенню, наведеному вище, або її фармацевтично прийнятна сіль.

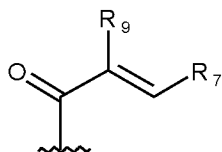
В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де A являє собою -OCH₂-, -N(R₆)CH₂-, -OCH₂CH₂-, -N(R₆)CH₂CH₂-, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де A являє собою -OCH₂- або -OCH₂CH₂-, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де A являє собою -OCH₂CH₂-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де B являє собою -C(O)-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою -C(CN)-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою -N-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₁ являє собою -CN, -C(O)C≡CR₈, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₁ являє собою групу формули



або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₂ являє собою H або метил, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₂ являє собою H, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₃ являє собою H, галоген, метил, метоксигрупу, етил, ізопропіл або циклопропіл, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₃ являє собою галоген (переважно F або Cl), або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₄ являє собою H або галоген, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₄ являє собою H або F, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₅ являє собою галоген (переважно Cl), або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₆ являє собою H або CH₃, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₉ являє собою H, F, Cl, -CH₂F, -CF₃ або -CH₂OH, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₉ являє собою H, або її фармацевтично прийнятна сіль.

5 У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₇ являє собою H, -CHF₂, -CH₂F, -CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂N(CH₃)₂ або -CH₂-морфолін, або її фармацевтично прийнятна сіль. У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₇ являє собою H, або її фармацевтично прийнятна сіль.

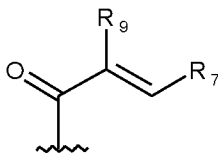
У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули 10 Ia, де R_9 являє собою H, а R_7 являє собою H, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$ або $-CH_2$ -морфолін, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₉ являє собою H, F, Cl, -CH₂F, -CF₃ або -CH₂OH, а R₇ являє собою H, або її фармацевтично прийнятна сіль.

15 У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де обидва R₇ і R₉ являють собою H, або її фармацевтично прийнятна сіль.

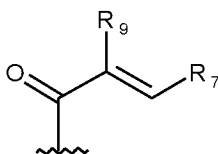
У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₁ являє собою -CN, -C(O)C≡CR₈, а R₈ являє собою H, метил, -CH₂F або -CH₂OH, або її фармацевтично прийнятна сіль.

20 У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₁ являє собою групу формули



25 обидва R₇ та R₉ являють собою H, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R₁ являє собою групу формули



30 R₇ являє собою трет-бутил, R₉ являє собою -CN, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де A являє собою $-\text{OCH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, B являє собою $-\text{C}(\text{O})-$, або її фармацевтично прийнятна сіль.

35 У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де A являє собою -OCH₂- або -OCH₂CH₂-, B являє собою -C(O)-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, В являє собою $-\text{C}(\text{O})-$, або її фармацевтично прийнятна сіль.

40 У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою -OCH₂-, -N(R₆)CH₂-, -OCH₂CH₂-, -N(R₆)CH₂CH₂-, В являє собою -O(O)-, R₂ являє собою Н або -CH₃, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою -OCH₂- або -OCH₂CH₂-, В являє собою -C(O)-, R₂ являє собою Н або метил, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою -OCH₂CH₂-, В являє собою -C(O)-, R₂ являє собою Н або метил, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули 50 Ia, де А являє собою -OCH₂-, -N(R₆)CH₂-, -OCH₂CH₂-, -N(R₆)CH₂CH₂-, В являє собою -C(O)-, R₂ являє собою H, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою $-\text{OCH}_2-$ або $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, В являє собою $-\text{C}(\text{O})-$, R_2 являє собою Н, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, В являє собою $-\text{C}(\text{O})-$, R_2 являє собою Н, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, R_2 являє собою Н або метил, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, R_2 являє собою Н, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де В являє собою $-\text{C}(\text{O})-$, R_2 являє собою Н або метил, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де В являє собою $-\text{C}(\text{O})-$, R_2 являє собою Н, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де кожен з-посеред R_3 і R_5 незалежно вибраний з-посеред Н, галогену або метилу, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R_3 або R_5 являє собою галоген, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де R_3 і R_5 являють собою галоген, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де кожен з-посеред R_3 і R_5 незалежно вибраний з-посеред F або Cl, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою $-\text{C}(\text{CN})-$, R_4 являє собою Н або галоген (переважно F або Cl), або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою $-\text{N}-$, R_4 являє собою Н або галоген (переважно F або Cl), або її фармацевтично прийнятна сіль.

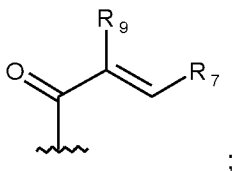
У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою $-\text{C}(\text{CN})-$, кожен з-посеред R_3 і R_5 незалежно вибраний з-посеред метилу або галогену, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою $-\text{C}(\text{CN})-$, кожен з R_3 і R_5 являє собою галоген (переважно F або Cl), або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою $-\text{N}-$, кожен з R_3 та R_5 незалежно вибраний з-посеред метилу або галогену, або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де Y являє собою $-\text{N}-$, кожен з R_3 і R_5 являє собою галоген (переважно F або Cl), або її фармацевтично прийнятна сіль.

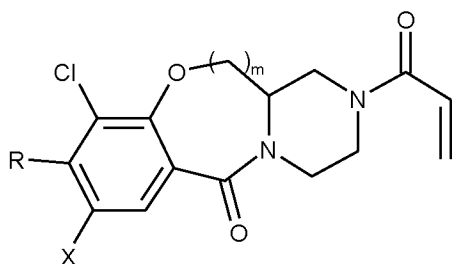
У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою $-\text{OCH}_2-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ або $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2$; В являє собою $-\text{CH}_2-$ або $-\text{C}(\text{O})-$; Y являє собою $-\text{C}(\text{CN})-$ або $-\text{N}-$; R_1 являє собою $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CR}_8$ або групу формули



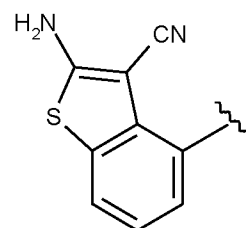
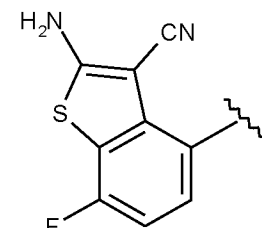
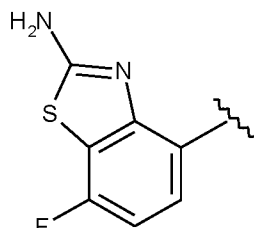
R_2 являє собою Н або метил; кожен з R_3 та R_5 являє собою Н, F, Cl або метил; R_4 являє собою Н або F; R_6 являє собою Н або метил; R_7 являє собою Н, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2$ -морфолін або трет-бутил; R_8 являє собою метил, $-\text{CH}_2\text{F}$ або $-\text{CH}_2\text{OH}$; R_9 являє собою Н, F, Cl, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{OH}$ або CN; або її фармацевтично прийнятна сіль.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або Формули Ia, де А являє собою -OCH₂- або -OCH₂CH₂-; В являє собою -CH₂- або -C(O)-; Y являє собою -C(CN)- або -N-; кожен з R₂, R₇ і R₈ являє собою H; R₄ являє собою H або галоген; кожен з R₃ та R₅ являє собою галоген; або її фармацевтично прийнятна сіль.

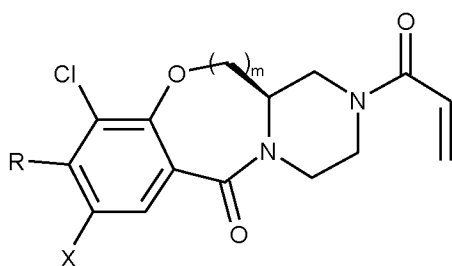
Окрім того, цим винаходом надана сполука Формули II



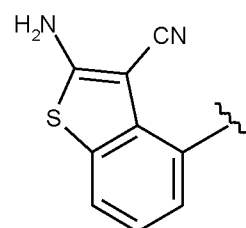
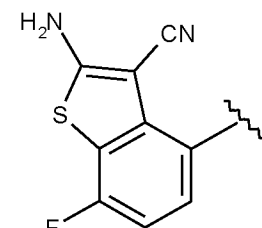
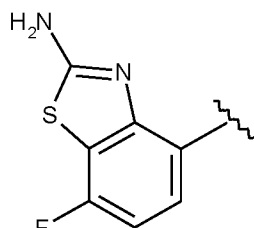
, Формула II



де R являє собою
X являє собою Cl або F;
і m дорівнює 1 або 2,
або її фармацевтично прийнятна сіль.
Цим винаходом надана сполука Формули IIa

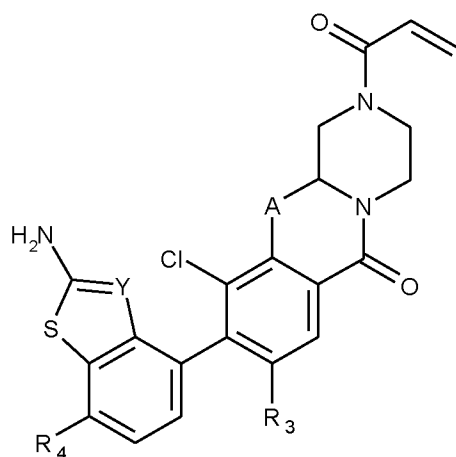


, Формула IIa



де R являє собою
X являє собою Cl або F;
і m дорівнює 1 або 2,
або її фармацевтично прийнятна сіль.

Інший спосіб описання сполуки Формули II полягає у її описанні через Формулу Ib



, Формула Ib

або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

A являє собою -OCH₂- або -OCH₂CH₂-;

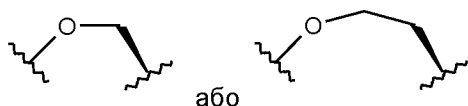
Y являє собою -C(CN)- або -N-;

R₃ являє собою Cl або F;

R₄ являє собою H або F у разі, коли Y являє собою C(CN); і

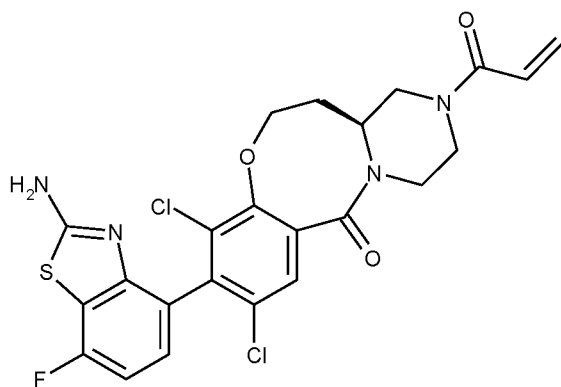
R₄ являє собою F у разі, коли Y являє собою N.

Інший спосіб описання сполуки Формули Ia полягає у її описанні через Формулу Ib, де A являє собою

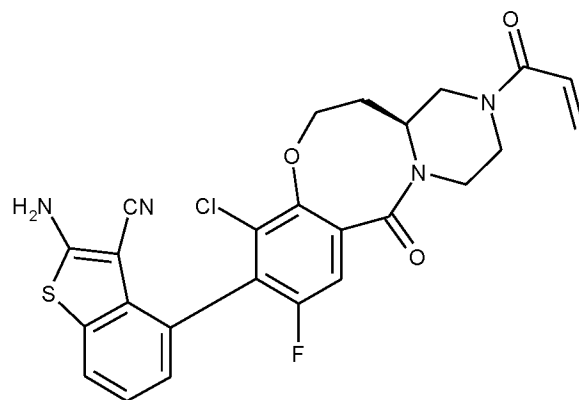


або

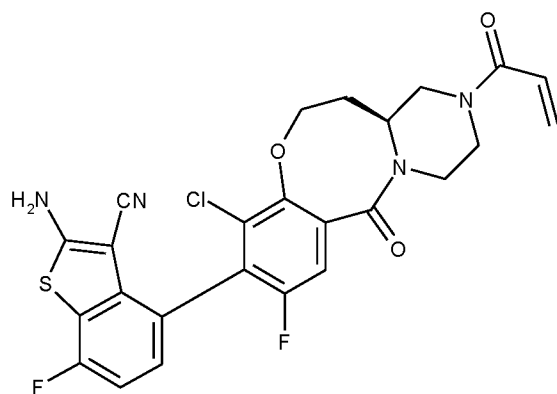
Цим винаходом також надана сполука, вибрана з-посеред будь-якої з наведених нижче сполук Формул III-VI



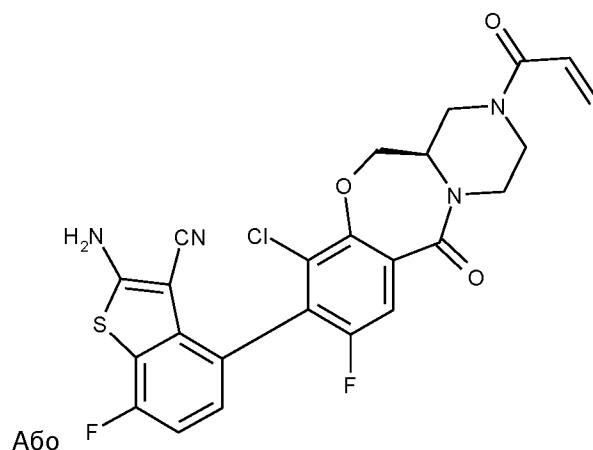
Формула III



Формула IV



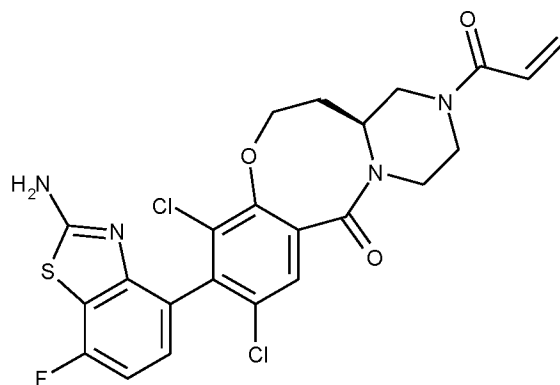
Формула V



Формула VI

або її фармацевтично прийнятна сіль.

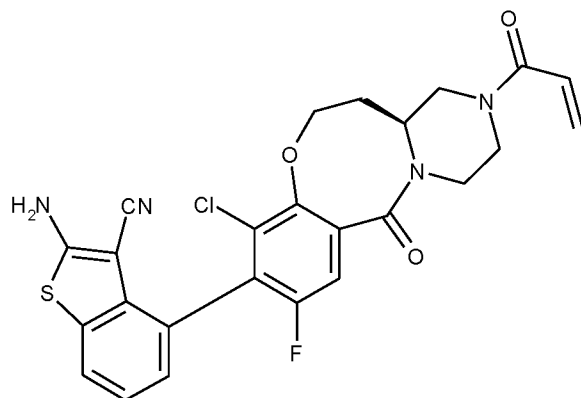
Крім того, цим винаходом надана сполука Формули III, яка являє собою



, Формула III

або її фармацевтично прийнятна сіль.

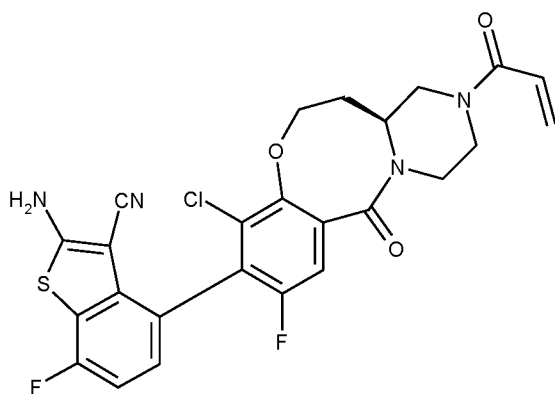
Крім того, цим винаходом надана сполука Формули IV, яка являє собою



, Формула IV

або її фармацевтично прийнятна сіль.

Крім того, цим винаходом надана сполука Формули V, яка являє собою

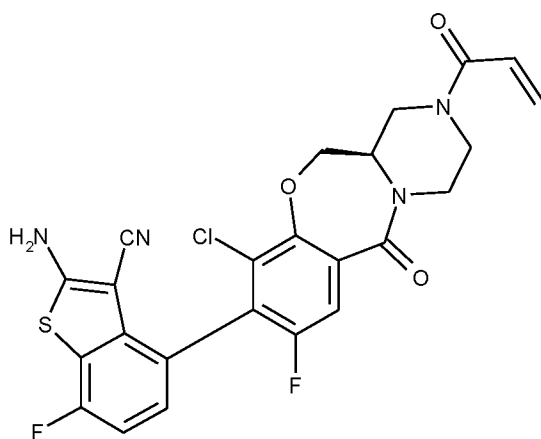


, Формула V

або її фармацевтично прийнятна сіль.

Крім того, цим винаходом надана сполука Формули VI, яка являє собою

5



, Формула VI.

або її фармацевтично прийнятна сіль.

10 Цим винаходом також надана фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

15 Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі. У різних варіантах здійснення цього винаходу рак являє собою рак легенів, колоректальний рак, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, рак шийки матки, рак ендометрія, рак яєчників, холангіокарциному або рак стравоходу. У варіантах здійснення цього винаходу, яким віддають перевагу, рак являє собою недрібноклітинний рак легенів, рак підшлункової залози або колоректальний рак. У варіантах здійснення цього винаходу, яким віддають ще більшу перевагу, раком є недрібноклітинний рак легенів.

20 Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою недрібноклітинну карциному легенів, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою колоректальну карциному, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою мутантний рак підшлункової залози, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування раку іншого походження, що несе мутантний білок Kras G12C.

25 30 Цим винаходом також наданий спосіб лікування пацієнта з раком, що має мутацію KRas G12C, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі.

Цим винаходом також наданий спосіб модулювання мутантного ферменту KRas G12C у пацієнта, що цього потребує, шляхом введення сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі. Переважно згаданий спосіб включає інгібування мутантного людського ферменту KRas G12C.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку у пацієнта, що цього потребує, при цьому пацієнт має рак, який, як було визначено, експресує мутантний білок KRas G12C. Згаданий спосіб включає введення пацієнту ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі. Мутаційний статус G12C однієї або декількох ракових клітин можна визначити із застосуванням ряду досліджень, відомих у цій галузі. Як правило, відбирають один або декілька біоптатів, що містять одну або декілька ракових клітин, і піддавали їх секвенуванню та/або полімеразній ланцюговій реакції (PCR). Можна також використовувати циркуляційну безклітинну ДНК, наприклад, при задованих формах раку. До необмежувальних прикладів методів секвенування та полімеразної ланцюгової реакції, які використовують для визначення мутаційного статусу (наприклад, мутаційний статус G12C в одній або декількох ракових клітинах або в циркуляційній безклітинній ДНК), включають пряме секвенування, секвенування наступного покоління, полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (RT-PCR), мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію, а також піросеквенування та мультианалітне профілювання.

Цим винаходом також надана сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-якою з Формул I-VI для застосування в терапії. Сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль можна застосовувати для лікування раку. Переважно згаданий рак являє собою рак легенів, колоректальний рак, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, рак шийки матки, рак ендометрія, рак яєчників, холангіокарциному або рак стравоходу. У варіантах здійснення цього винаходу, яким віддають перевагу, згаданий рак являє собою недрібноклітинний рак легенів, рак підшлункової залози або колоректальний рак. У варіантах здійснення цього винаходу, яким віддають ще більшу перевагу, згаданий рак являє собою недрібноклітинний рак легенів. У інших варіантах здійснення цього винаходу згаданий рак має одну або декілька ракових клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Переважно згаданий рак вибирають з-посеред: KRas G12C мутантного недрібноклітинного раку легенів, KRas G12C мутантного колоректального раку та KRas G12C мутантного раку підшлункової залози. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою недрібноклітинний рак легенів, і одна або декілька клітин експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою колоректальний рак, і одна або декілька клітин експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою рак підшлункової залози, і одна або декілька клітин експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу пацієнт має рак, який був визначений таким, що має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C, до введення сполуки або її фармацевтично прийнятної солі.

Цим винаходом також надане застосування сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі у виробництві лікарського засобу для лікування раку. Переважно згаданий рак являє собою рак легенів, колоректальний рак, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, рак шийки матки, рак ендометрія, рак яєчників, холангіокарциному або рак стравоходу. У варіантах здійснення цього винаходу, яким віддають перевагу, згаданий рак являє собою недрібноклітинний рак легенів, рак підшлункової залози або колоректальний рак. У варіантах здійснення цього винаходу, яким віддають ще більшу перевагу, згаданий рак являє собою недрібноклітинний рак легенів. У інших варіантах здійснення цього винаходу згаданий рак має одну або декілька ракових клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Переважно згаданий рак вибирають з-посеред KRas G12C мутантного недрібноклітинного раку легенів, KRas G12C мутантного колоректального раку і KRas G12C мутантного раку підшлункової залози.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі та одного або декількох з-посеред інгібітора PD-1, інгібітора PD-L1, інгібітора CD4/CDK6 або його фармацевтично прийнятної солі, інгібітора EGFR або його фармацевтично прийнятної солі, інгібітора ERK або його фармацевтично прийнятної солі, препарату платини та пеметрекседу або його фармацевтично прийнятної солі, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана сполука за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятна сіль для використання в одночасній, окремії або послідовній комбінації з одним або декількома інгібіторами PD-1 або PD-L1, інгібітором CD4/CDK6 або його фармацевтично прийнятною сіллю, інгібітором EGFR або

його фармацевтично прийнятною сіллю, інгібітором ERK або його фармацевтично прийнятною сіллю, препаратом платини та пеметрекседом або його фармацевтично прийнятною сіллю у лікуванні раку. Цим винаходом також надана комбінація, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль і один або декілька інгібіторів PD-1 або PD-L1, інгібітор CD4/CDK6 або його фармацевтично прийнятну сіль, інгібітор EGFR або його фармацевтично прийнятну сіль, інгібітор ERK або його фармацевтично прийнятну сіль, препарат платини та пеметрексед або його фармацевтично прийнятну сіль, для одночасного, окремого або послідовного застосування в лікуванні раку.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі та інгібітора PD-1 або PD-L1, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана сполука за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятна сіль для використання в одночасній, окремій або послідовній комбінації з інгібітором PD-1 або PD-L1 для застосування в лікуванні раку. Цим винаходом також надана комбінація, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль та інгібітор PD-1 або PD-L1, для одночасного, окремого або послідовного застосування в лікуванні раку. В одному з варіантів здійснення цього винаходу сполука являє собою сполуку Формули I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є пембролізумаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є ніволумаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є циміплімаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є синтілімаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є атезолізумаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є авелумаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є дурвалумаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором PD-1 або PD-L1 є лодапілімаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу рак являє собою недрібноклітинну карциному легенів, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою колоректальну карциному, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою мутантний рак підшлункової залози, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування раку іншого походження, який несе мутацію KRas G12C.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, що включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі та інгібітора CDK4/CDK6 або його фармацевтично прийнятної солі, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана сполука за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятна сіль для використання в одночасній, окремій або послідовній комбінації з інгібітором CDK4/CDK6 або його фармацевтично прийнятною сіллю для застосування в лікуванні раку, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана комбінація, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль і інгібітор CDK4/CDK6 або його фармацевтично прийнятну сіль, для одночасного, окремого або послідовного застосування в лікуванні раку, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором CDK4/CDK6 є абемацикліб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором CDK4/CDK6 є палбоцикліб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором CDK4/CDK6 є рибоцикліб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою недрібноклітинну карциному легенів, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою колоректальну карциному, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу рак являє собою мутантний рак підшлункової залози, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку іншого походження, що несе мутацію KRas G12C.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі та інгібітора EGFR або його фармацевтично прийнятної солі, при цьому

згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана сполука за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятна сіль для використання в одночасній, окремій або послідовній комбінації з інгібітором EGFR або його фармацевтично прийнятною сіллю для лікування раку. Цим винаходом також надана комбінація, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль і інгібітор EGFR або його фармацевтично прийнятну сіль, для одночасного, окремого або послідовного застосування в лікуванні раку. В одному з варіантів здійснення цього винаходу згадана сполука являє собою сполуку Формули I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором EGFR є ерлотиніб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором EGFR є афатиніб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором EGFR є гефітиніб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором EGFR є цетуксимаб. У іншому варіанті здійснення цього винаходу рак являє собою недрібноклітинну карциному легенів, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу рак являє собою колоректальну карциному, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою мутантний рак підшлункової залози, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування раку іншого походження, який несе мутацію KRas G12C.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі та інгібітора ERK або його фармацевтично прийнятної солі, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана сполука за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятна сіль для використання в одночасній, окремій або послідовній комбінації з інгібітором ERK або його фармацевтично прийнятною сіллю в лікуванні раку, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана комбінація, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль і інгібітор ERK або його фармацевтично прийнятну сіль, для одночасного, окремого або послідовного застосування в лікуванні раку. В одному з варіантів здійснення цього винаходу згадана сполука являє собою сполуку Формули I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором ERK є LY3214996. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором ERK є LTT462. У іншому варіанті здійснення цього винаходу інгібітором ERK є KO-947. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою недрібноклітинну карциному легенів, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою колоректальну карциному, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою мутантний рак підшлункової залози, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування раку іншою походження, який несе мутацію KRas G12C.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі та препарату платини, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана сполука за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятна сіль для використання в одночасній, окремій або послідовній комбінації з препаратом платини або його фармацевтично прийнятною сіллю для лікування раку, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана комбінація, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль і препарат платини, для одночасного, окремого або послідовного застосування в лікуванні раку. В одному з варіантів здійснення цього винаходу сполука являє собою сполуку Формули I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль. У іншому варіанті здійснення цього винаходу препаратом платини є цисплатин. У іншому варіанті здійснення цього винаходу препаратом платини є карбоплатин. У іншому варіанті здійснення цього винаходу препаратом платини є оксалиплатин. У іншому варіанті здійснення цього винаходу рак являє собою недрібноклітинну карциному легенів, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою колоректальну

карциному, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу рак являє собою мутантний рак підшлункової залози, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування раку іншого походження, який несе мутацію KRas G12C.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятної солі та пеметрекседу, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана сполука за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятна сіль для використання в одночасній, окремій або послідовній комбінації з пеметрекседом для лікування раку, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. Цим винаходом також надана комбінація, яка містить сполуку за будь-якою з Формул I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль і пеметрексед, для одночасного, окремого або послідовного застосування в лікуванні раку, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. В одному з варіантів здійснення цього винаходу сполука являє собою сполуку Формули I-VI або її фармацевтично прийнятну сіль. У іншому варіанті здійснення цього винаходу рак являє собою недрібноклітинну карциному легенів, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C, У іншому варіанті здійснення цього винаходу пацієнту також вводять препарат платини. У іншому варіанті здійснення цього винаходу препаратом платини є цисплатин. У іншому варіанті здійснення цього винаходу препаратом платини є карбоплатин. У іншому варіанті здійснення цього винаходу препаратом платини є оксаліплатин. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою колоректальну карциному, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак являє собою мутантний рак підшлункової залози, при цьому згаданий рак має одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C. У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування раку іншого походження, який несе мутацію KRas G12C.

Термін "фармацевтично прийнятна сіль" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується солі сполуки, яка вважається прийнятною для клінічного та/або ветеринарного застосування. Приклади фармацевтично прийнятних солей та загальну методологію їх одержання можна знайти в "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" P. Stahl, et al., 2nd Revised Edition, Wiley-VCH, 2011 та S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, 66(1), 1-19.

Фармацевтичні композиції для цього винаходу можна одержати з використанням фармацевтично прийнятних домішок. Термін "фармацевтично прийнятна домішка" у значенні, вживаному у цьому описі для фармацевтичних композицій, стосується одного або декількох носіїв, розріджувачів і наповнювачів, які є сумісними з іншими домішками композиції або рецептури та не є шкідливими для пацієнта. Приклади фармацевтичних композицій та способів їх одержання можна знайти в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Loyd, V., et al. Eds., 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Необмежувальні приклади фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів та наповнювачів включають: фізіологічний розчин, вода, крохмаль, цукор, маніт і похідні кремнезему; зв'язувальні речовини, такі як карбоксиметилцелюлоза, альгірати, желатин і полівінілпіролідон; каолін і бентоніт; і поліетилгліколи.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "ефективна кількість" стосується кількості, яка є дозою, що є ефективною в лікуванні розладу або захворювання, такого як ракове ураження або прогресування аномального росту клітин та/або поділу клітин. Лікар, який здійснює лікування, як фахівець в цій галузі, може легко визначити ефективну кількість із застосуванням звичайних методів і шляхом спостереження за результатами, одержаними за аналогічних обставин. Дози на добу лікування зазвичай становлять від приблизно 1 мг на добу або двічі на добу до 1000 мг на добу або двічі на добу, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, 100 мг на добу або двічі на добу і 900 мг на добу або двічі на добу. До факторів, які враховуються при визначенні ефективної кількості або дози сполуки, належать: чи буде введена сполука або її сіль; одночасне застосування інших засобів, якщо вони використовуються; вид пацієнта, який підлягає лікуванню; розмір, вік і загальний стан пацієнта; ступінь залучення або стадія та/або тяжкість розладу; реакція окремого пацієнта; спосіб введення; характеристики біодоступності введеного препарату; обраний режим дозування; та застосування інших супутніх лікарських препаратів.

Лікар, ветеринар або інший медичний працівник, що здійснює лікування, зможе визначити ефективну кількість сполуки для лікування пацієнта, що цього потребує. Фармацевтичним композиціям, яким віддають перевагу, може бути наданий вигляд таблеток або капсул для перорального введення, розчину для перорального введення або розчину для ін'єкцій.

5 Таблетка, капсула або розчин можуть містити сполуку за цим винаходом в кількості, ефективній для лікування пацієнта, що потребує лікування від раку.

У значенні, вживаному у цьому описі, терміни "лікування" або "лікувати" включають уповільнення, зменшення або зворотний розвиток прогресування або тяжкості наявного симптому, розладу, стану, що може включати безпосередньо уповільнення росту ракової

10 пухлини, ураження або прогресування аномального росту клітин та/або поділу клітин.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "пацієнт" стосується ссавця, який потребує лікування. Переважно пацієнтом є людина, що потребує лікування від раку, наприклад, раку, що має мутацію KRas G12C.

Деякі скорочення визначені нижче: "ACN" означає ацетонітрил; "AIBN" означає азобісізообутиронітрил; "Boc-Gly-OH" означає N-трет-бутоксикарбоніл)гліцин; "DCM" означає дихлорметан; "DIEA" означає N,N-діізопропілетиламін; "DMAP" означає 4-диметиламінопіридин; "DMEM" означає модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла; "DMF" означає N,N-диметилформамід; "DMSO" означає диметилсульфоксид; "ДНК" означає дезоксирибонуклеїнову кислоту; "DPEPhosPdCl₂" означає дихлорбіс(дифенілфосфінофеніл)ефір паладію (II); "DTT" означає дитіотреїтол; "EGTA" означає етилендіамінтетраоцтову кислоту; "EGTA" означає етиленгліколь-біс(β-аміноетиловий ефір)-N,N,N',N'-тетраоцтову кислоту; "ELISA" означає твердофазний імуноферментний аналіз; "ERK" означає кінази, регульовані позаклітинним сигналом; "EtOAc" означає етилацетат; "EtOH" означає етанол; "FBS" означає фетальну бичачу сироватку; "GDP" означає гуанозиндифосфат; "GTP" означає гуанозинтрифосфат; "HPLC" означає рідинну хроматографію високої ефективності; "HRP" означає пероксидазу хрому; "IPA" означає ізопропіловий спирт; "IPAm" означає ізопропіламін; "LC-ES/MS" означає рідинну хроматографію/електророзпилення/мас-спектрометрію; "LC-MS" означає рідинну хроматографію/мас-спектрометрію; "MAPK" означає мітоген-активовані протеїнкінази; "MeOH" означає метанол; "NaOMe" означає метоксид натрію; "NBS" означає N-бромсукцинімід; "NCS" означає N-хлорсукцинімід; "NMP" означає 1-метилпіролідін-2-он; "PCR" означає полімеразну ланцюгову реакцію; "RPMI" означає живильне середовище RPMI 1640 (інститут рака Розуела Парка); "SCX" означає сильний катіонний обмін; "TEA" означає триетиламін; "TFA" означає трифтороцтову кислоту; і "THF" означає тетрагідрофуран.

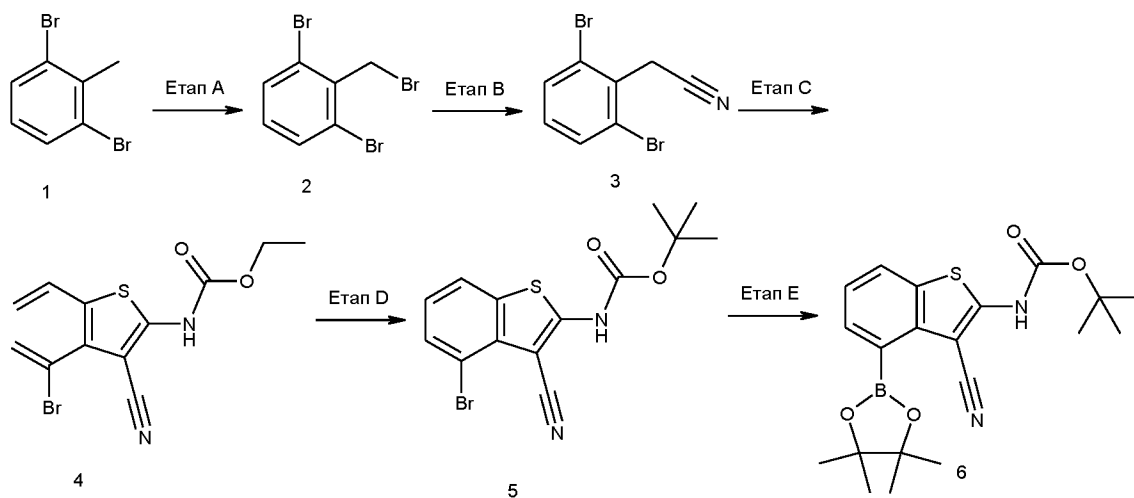
Окремі ізомери, енантіомери, діастереомери та атропізомери можуть бути розділені або відокремлені в будь-якій зручній точці синтезу сполук, перелічених нижче, із застосуванням таких методів, як методи селективної кристалізації або хіральна хроматографія (Дивись, наприклад, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, та E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Цей винахід охоплює певні сполуки, які є атропізомерами, і які можуть існувати в різних конформаціях або у вигляді різних ротомерів. Атропізомери являють собою сполуки, які існують у різних конформаціях, що виникають внаслідок обмеженого обертання навколо одного зв'язку. Атропізомери можна виділити як молекули окремих хімічних видів, якщо енергетичний бар'єр обертання навколо одинарного зв'язку достатньо високий, а швидкість взаємоперетворення достатньо повільна, щоб дозволити окремим ротомерам відокремитись один від іншого. У цьому винаході розглядаються всі ізомери, енантіомери, діастереомери та атропізомери, розкриті у цьому описі або які можуть бути одержані з використанням сполук, розкритих у цьому описі.

Сполука будь-якої з Формул I-VI легко перетворюється на фармацевтично прийнятну сіль і може бути виділена як фармацевтично прийнятна сіль. Утворення солі може відбуватись при додаванні фармацевтично прийнятної кислоти для одержання солі приєднання кислоти. Солі також можуть утворюватись одночасно після зняття захисту азоту або кисню, тобто видалення захисної групи. Приклади, реакції та умови утворення солі можна знайти в 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); та Berge, S.M., et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, **66**: 1-19, (1977).

Сполуки за цим винаходом або їх солі можуть бути одержані за різноманітними процедурами, деякі з яких проілюстровані в наведених нижче Препаративних методиках і Прикладах. Конкретні етапи синтезу для кожного з описаних шляхів можна комбінувати різним чином або поєднувати з етапами різних шляхів для одержання сполук або солей за цим

винаходом. Продукти кожного етапу в Препаративних методиках, наведених нижче, можна відновити звичайними методами, включаючи екстрагування, випарювання, осадження, хроматографування, фільтрування, розтирання та кристалізування.

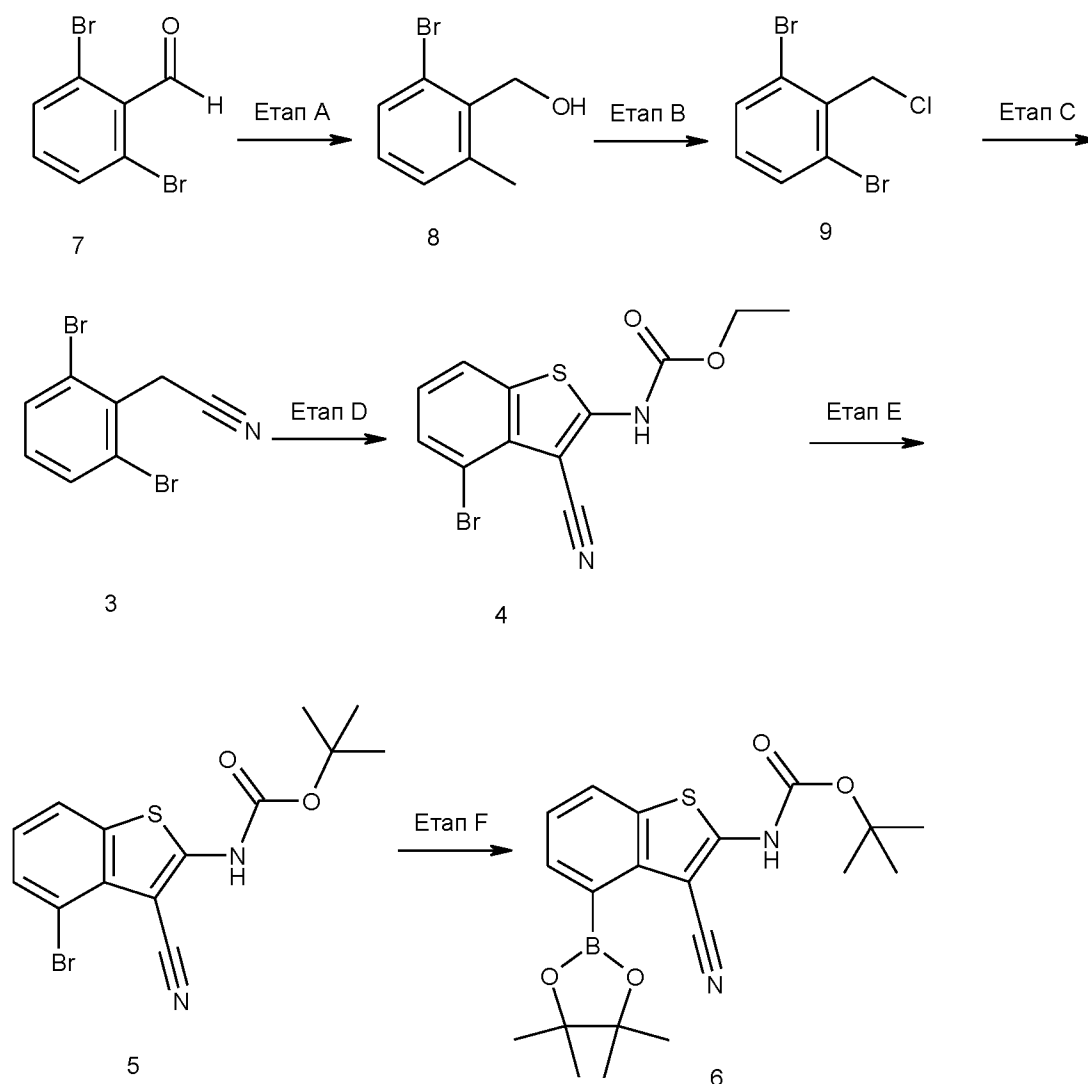
5 Схеми 1



На Схемі I, етап А, зображено бромовання сполуки (1) з використанням NBS та AIBN у прийнятному розчиннику, такому як CCl_4 , для одержання сполуки (2). Етап В показує нуклеофільне заміщення сполуки (2) шляхом нагрівання ціаніду калію зі зворотним холодильником у прийнятній системі розчинників, такий як EtOH та вода, для одержання сполуки (3). На етапі С показано додавання етоксикарбонілізотіоціанату до сполуки (3) з використанням гідриду натрію у прийнятному розчиннику, такому як DMF, і подальше циклізування до сполуки (4). На етапі D показано основне депротектування сполуки (4) водним розчином NaOH при нагріванні DMSO зі зворотним холодильником та подальшим повторним захистом з використанням ди-трет-бутилдикарбонату з прийнятною основою, такою як DIEA, та каталітичним DMAP, у системі розчинників, такий як THF і DMF, для одержання сполуки (5). Етап Е показує реакцію бром сполуки (5) з біс(пінаcolato)дибором, з використанням прийнятною основи, такої як ацетат калію, і системи каталізатор-ліганд, такої як ацетат паладію та 1,1'-біс(діізопропілфосфіно)фероцен, у прийнятному розчиннику, такому як 1,4-діоксан, для одержання сполуки (6). Фахівець у цій галузі зрозуміє, що для здійснення цієї реакції можна використовувати різноманітні комбінації каталізатор-ліганд.

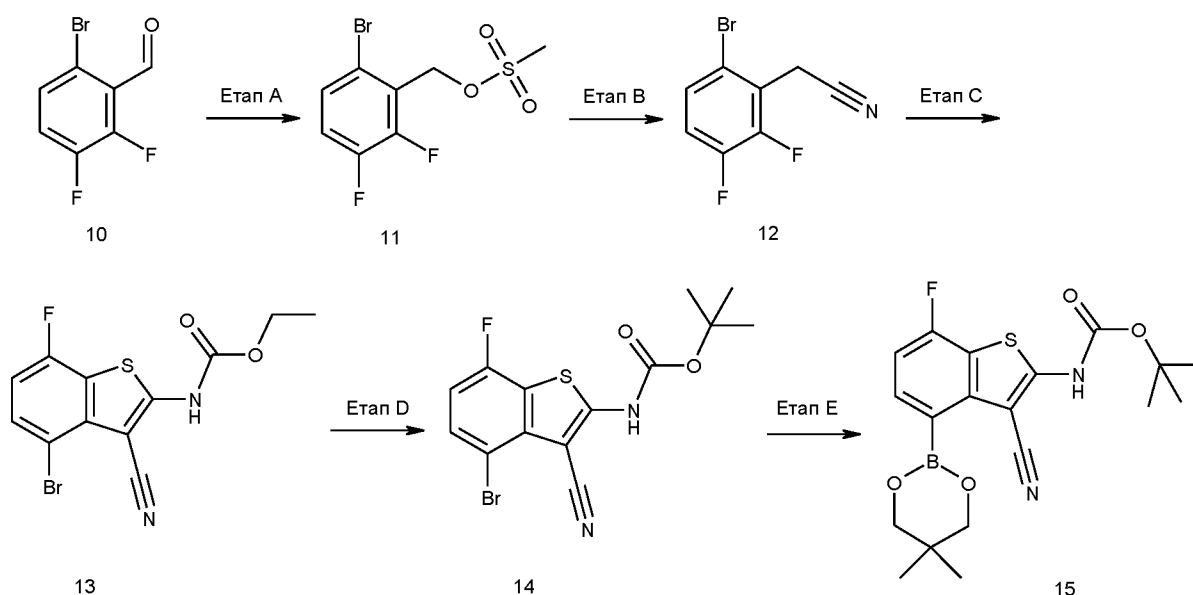
25

Схема 2



- 5 Схема 2 зображує альтернативний шлях синтезу сполуки (6). Етап А зображує відновлення бензальдегіду (7) з використанням відповідного відновника, такого як боргідрид натрію, у відповідному розчиннику, такому як EtOH, для одержання сполуки (8). Етап В показує хлорування сполуки (8) з використанням тіонілхлориду у відповідному розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки (9). Етап С зображує нуклеофільне заміщення в сполуці (9) з використанням ціаніду калію у відповідному розчиннику, такому як DMSO, для одержання сполуки (3). Додавання етоксикарбонілізотіюанату до сполуки (3) з використанням гідриду натрію у прийнятному розчиннику, такому як DMF, і подальша циклізація з використанням L-проліну та CuI для одержання сполуки (4) показано на етапі D. Основне зняття захисту сполуки (4) з використанням водного розчину NaOH при нагріванні DMSO зі зворотним холодильником з подальшим повторним захистом з використанням ци-трет-бутилдикарбонату з прийнятною основою, такою як DIEA та каталітичним DMAP, у розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (5), зображено на етапі E. Етап F показує реакцію бром сполуки (5) з біс(пінаколато)дибором з використанням прийнятої основи, такої як ацетат калію, та системи каталізатор-ліганд, такої як ацетат паладію та біс(2-дифенілфосфінофеніл)ефір, у прийнятному розчиннику, такому як 1,4-діоксан, для одержання сполуки (6). Фахівець у цій галузі зрозуміє, що для здійснення цієї реакції можна використовувати різноманітні комбінації каталізатор-ліганд.

Схема 3

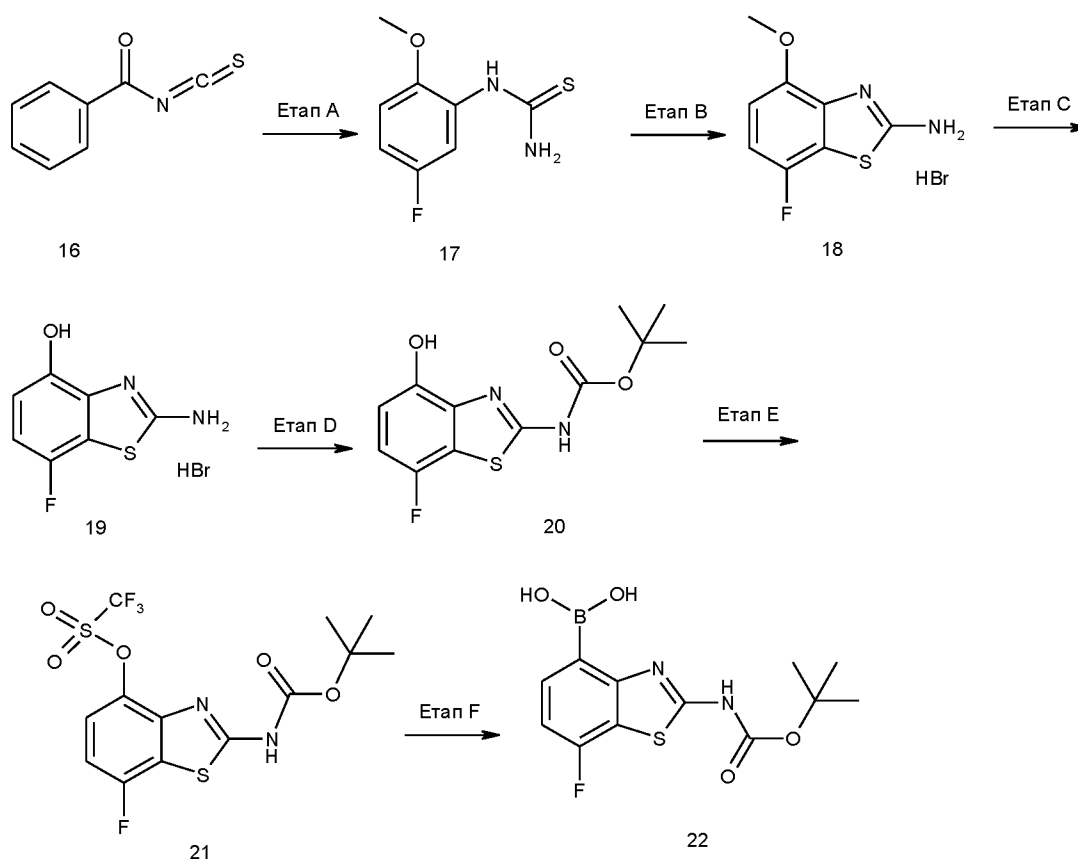


5

На Схемі 3, етап А, зображено відновлення альдегіду сполуки (10) боргідридом натрію в MeOH і подальше мезилування з використанням метансульфонового ангідриду з прийнятною основою, такою як DIEA, у розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (11). Умови, які використовуються для перетворення сполуки (11) на сполуку (12), по суті аналогічні тим, які описані на Схемі 1, етап В. Додавання етоксикарбонілізотіоціанату до сполуки (12) з використанням трет-бутоксиду калію у прийнятному розчиннику, такою як DMF, та подальше циклізування до сполуки (13) показані на етапі С. Умови, які використовуються для перетворення сполуки (13) на сполуку (14), по суті аналогічні тим, які описані на Схемі I, етап D. Етап Е показує реакцію бром сполуки (14) з біс(неопентилгліcolato)дибором, використовуючи відповідну основу, таку як ацетат калію, і систему каталізатор-ліганд, таку як DPEPhosPdCl₂, у прийнятному розчиннику, такому як 1,4-діоксан, для одержання сполуки (15). Фахівець у цій галузі зрозуміє, що для здійснення цієї реакції можна використовувати різноманітні комбінації каталізатор-ліганд.

20

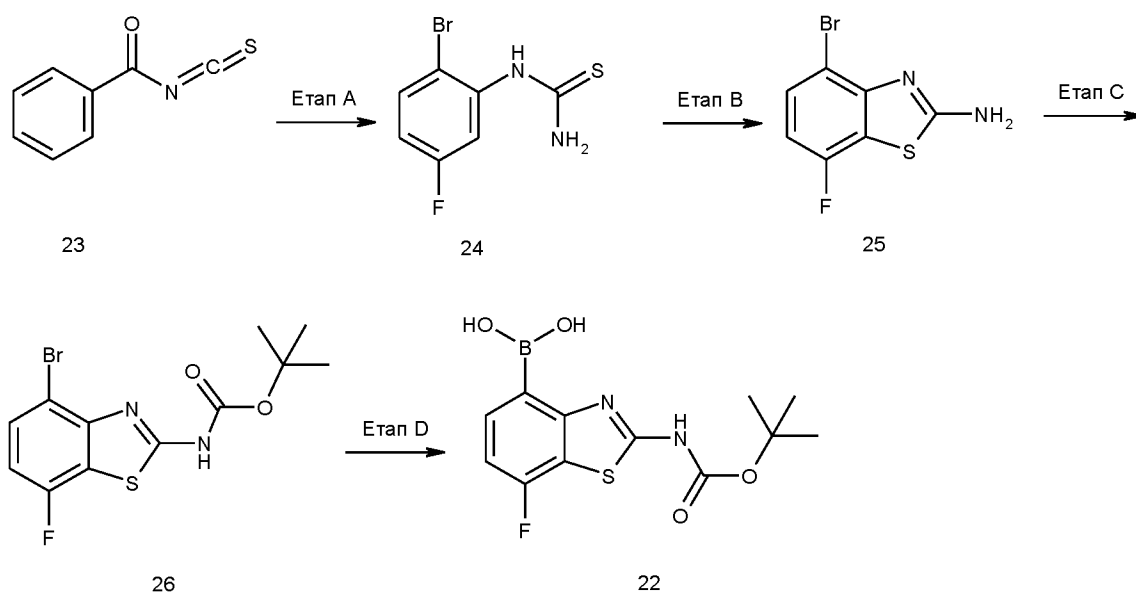
Схема 4



5 На Схемі 4, етап А, зображено одержання тіосечовини в результаті реакції сполуки (16) і 5-
 фтор-2-метоксіаніліну при підтриманні прохолодної температури реакційної суміші, з
 подальшим основним зняттям захисту для одержання сполуки (17). Етап В показує циклізацію
 10 сполуки (17) у хлороформі після додавання бромиду для одержання сполуки (18). Етап С описує
 деметилювання сполуки (18), яке може бути досягнуто додаванням BBr_3 при підтриманні
 прохолодної температури реакційної суміші в інертній атмосфері для одержання сполуки (19).
 Етап D показує захист сполуки (19) ди-трет-бутилдикарбонатом з використанням відповідної
 15 основи, такої як TEA та каталітичною DMAP, у системі розчинників, таких як 1,4-діоксан, для
 одержання сполуки (20). Сполуку (20) обробляли основою, такою як піридин, після чого
 трифторметансульфоновим ангідридом у розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки
 (21), як показано на етапі Е. Етап F зображує реакцію трифлату сполуки (21) з
 біс(пінаколато)дибором з використанням прийнятної основи, такої як ацетат калію, та
 каталізатора, такого як тетракіс(трифенілфосфін)паладій(0), у прийнятному розчиннику, такому
 як 1,4-діоксан, для одержання сполуки (22). Фахівець у цій галузі зрозуміє, що для здійснення
 цієї реакції можна використовувати різноманітні комбінації каталізатор-ліганд.

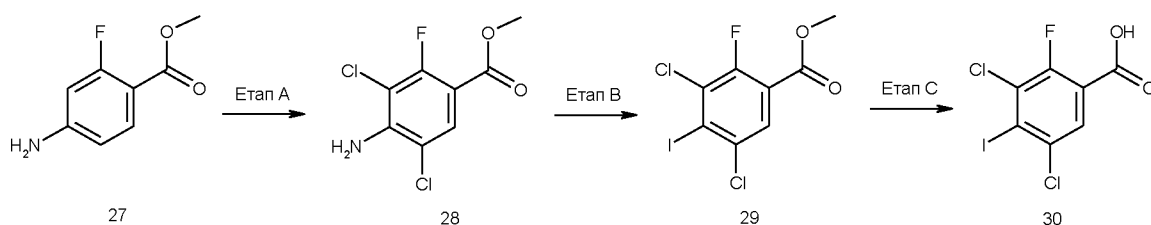
20

Схема 5



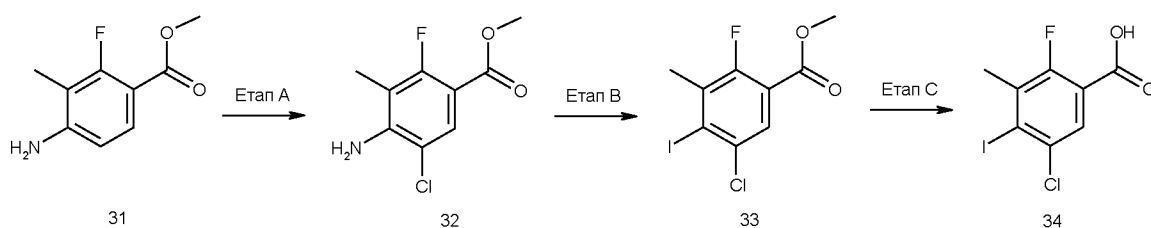
На Схемі 5 зображений альтернативний шлях синтезу сполуки (22). Етап А зображує одержанням тіосечовини в результаті реакції сполуки (23) і 2-бром-5-фтораніліну в розчиннику, такому як THF, з подальшим основним зняттям захисту для одержання сполуки (24). Етап В показує бромовання та циклізацію сполуки (24) з використанням відповідної бромувальної речовини, такої як трибромід піридинію, у розчиннику, такому як сірчана кислота, для одержання сполуки (25). Етап С показує захист сполуки (25) ди-трет-бутилдикарбонатом з використанням прийнятої основи, такої як DMAP, у системі розчинників, такий як DCM, для одержання сполуки (26). Етап D зображує перетворення сполуки (26) на сполуку (22) шляхом оброблення гідридом натрію в розчиннику, такому як THF, при низьких температурах з подальшим додаванням н-бутиллітію та триізопропілборату.

Схема 6



На схемі 6, етап А зображено хлорування сполуки (27) з використанням NCS у відповідному розчиннику, такому як DMF, для одержання сполуки (28). Етап В показує реакцію Зандмейєра для перетворення азоту аніліну сполуки (28) на йод, умови якої будуть відомі фахівцю в цій галузі, для одержання сполуки (29). Етап С показує основний гідроліз складного ефіру сполуки (29) до кислоти сполуки (30).

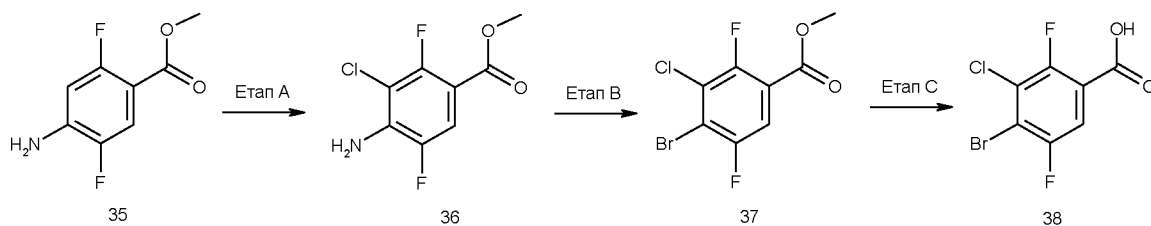
Схема 7



Етапи А-С Схеми 7 виконуються по суті методом, аналогічним методам, які базуються на етапах А-С Схеми 6, для одержання сполуки (32-34).

Схема 8

5

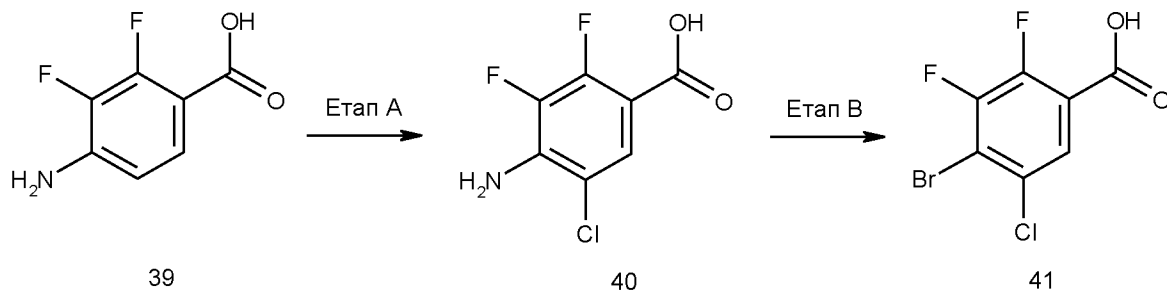


Етап А Схеми 8 виконують по суті методом, аналогічним методу на етапі А Схеми 6, для одержання сполуки (36). Етап В показує реакцію Зандмейсера для перетворення азоту аніліну сполуки (36) на бром, умови якої будуть відомі фахівцю в цій галузі, для одержання сполуки (37). Етап С виконують по суті у спосіб, аналогічний методу на етапі С Схеми 6, для одержання сполуки (38).

10

Схема 9

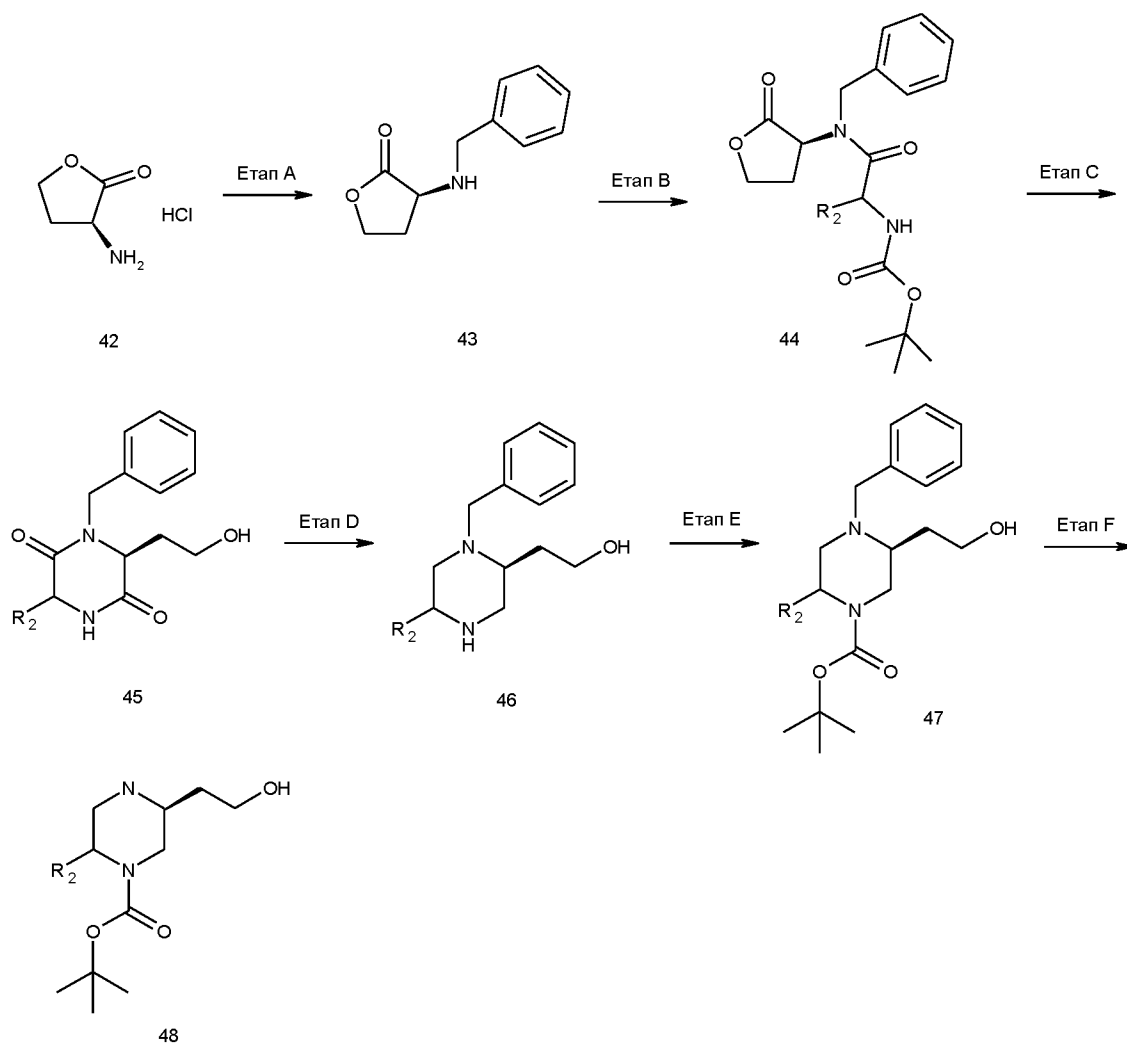
15



Етап А Схеми 9 виконують по суті у спосіб, аналогічний методу на етапі А Схеми 6, для одержання сполуки (40). Етап В виконують по суті методом, аналогічним методу на етапі В Схеми 8, для одержання сполуки (41).

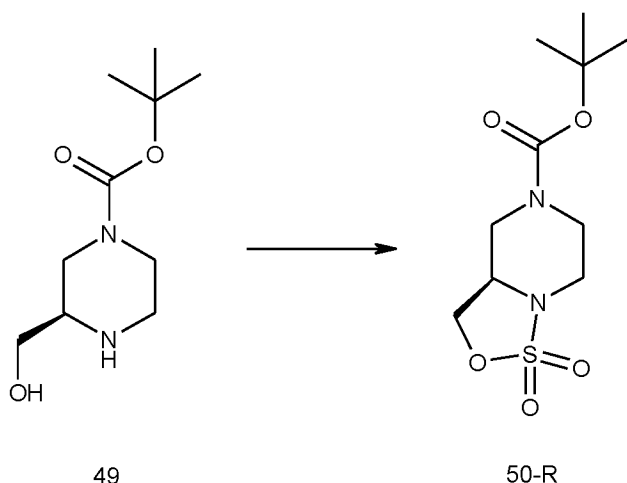
20

Схема 10



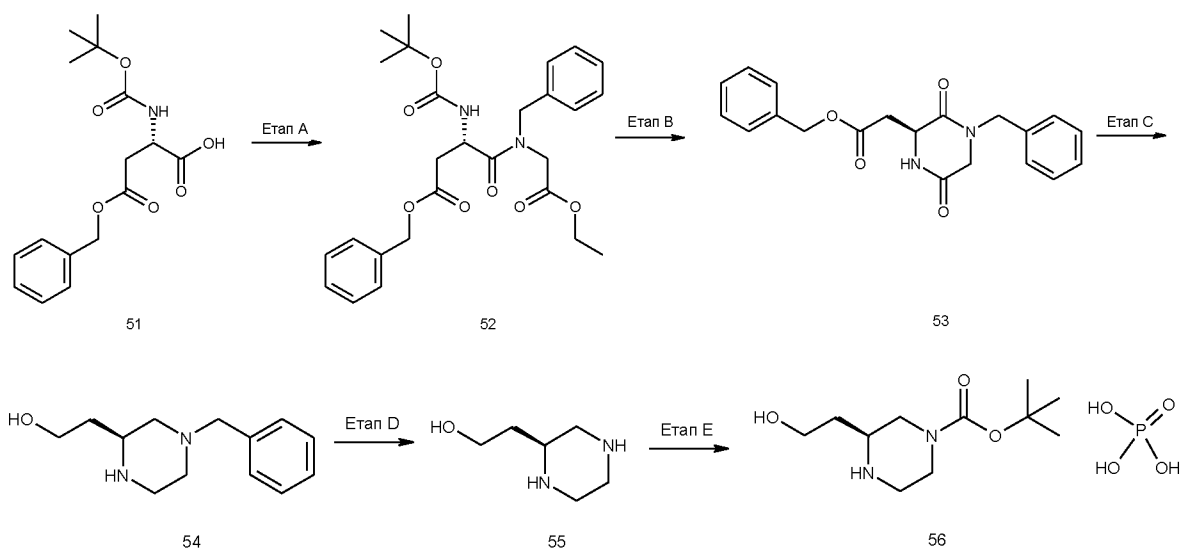
- 5 Схема 10, етап А, зображує відновне амінування між сполукою (42) і бензальдегідом у прийнятному розчиннику, такому як DCM, з прийнятим відновником, таким як триацетоксиборогідрид натрію, для одержання сполуки (43). Етап В показує амідне сполучення між сполукою (43) і бос-захищеною амінокислотою з використанням пропілфосфонового ангідриду з прийнятною основою, такою як TEA, у розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки (44). Етап С зображує кислотне депротектування та перегрупування сполуки (44) з використанням TFA у розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки (45). Етап D показує загальне відновлення амідом сполуки (45) з використанням відновника, такого як алюмогідрид літію, у розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (46). Етап Е зображує захист сполуки (46) з використанням ди-трет-бутилдикарбонату у водному розчині бікарбонату натрію для одержання сполуки (47). Етап F показує депротектування сполуки (47) шляхом гідрування для одержання сполуки (48).

Схема 11



- 5 На схемі 11 показана циклізація сполуки (49) з використанням тіонілхлориду та імідазолу в розчиннику, такому як DCM, при -78°C з подальшим обробленням періодатом натрію та хлоридом рутенію (III) в ACN для одержання сполуки (50-R). S-енантіомер (50-S) синтезують у тих самих умовах.

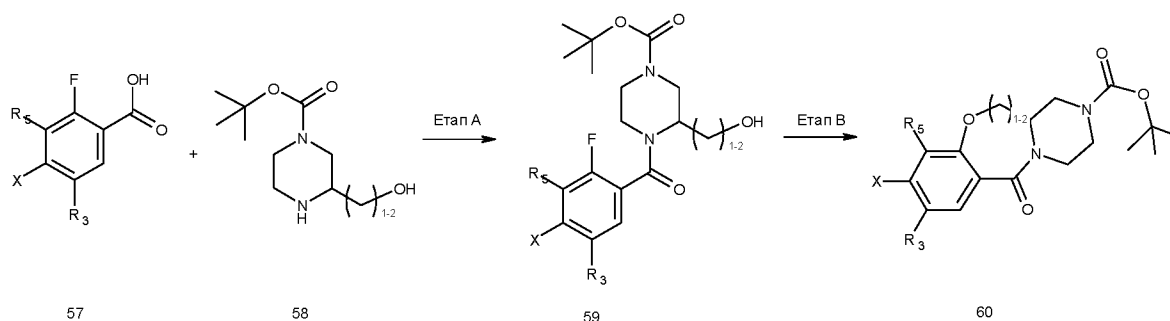
10 Схема 12



15

- На Схемі 12, етап А, показано амідне сполучення між сполукою (51) і етиловим складним ефіром бензилгліцину з використанням прийнятної сполучної речовини, такої як N,N'-дициклогексилкарбодіїмід, у розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки (52). Етап В зображує циклізацію сполуки (52) та сполуки (53) з використанням кислоти, такої як TFA, у розчиннику, такому як DCM. Етап С описує загальне відновлення аміду та зняття захисту сполуки (53) з використанням відновника, такого як алюмогідрид літію, у розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (54). Етап D показує гідрування сполуки (54) до сполуки (55) з використанням прийнятного каталізатора, такого як $\text{Pd}(\text{OH})_2$, у розчиннику, такому як MeOH. Етап Е зображує захист сполуки (55) ди-трет-бутилдікарбонатом і подальше утворення солі з використанням фосфорної кислоти для одержання сполуки (56).

Схема 13

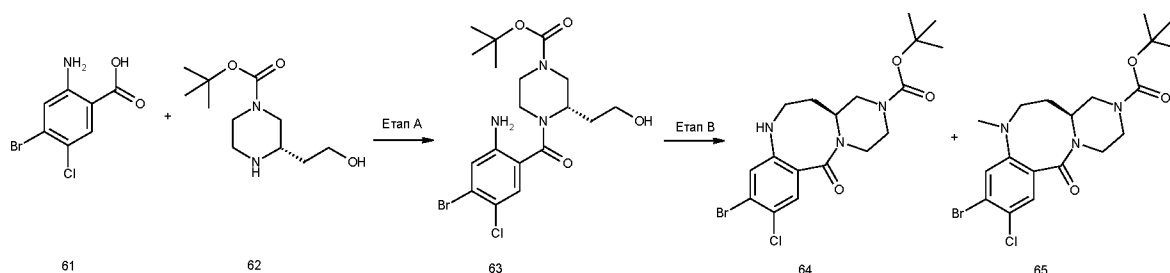


5

На Схемі 13 сполука (57) показує бензойні кислоти зі Схем 6-9, а також наявні у продажу бензойні кислоти. На етапі А показано амідне сполучення між сполукою (57) і сполукою (58) з використанням HATU та відповідної основи, такої як DIEA, в розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (59). Як альтернатива, амідне сполучення здійснюють з використанням 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазину і відповідної основи, такої як 4-метилморфолін, у розчиннику, такому як THF. Фахівцю у цій галузі буде зрозуміле існування найрізноманітніших умов, за яких можна виконувати амідне сполучення. Етап В зображує внутрішньомолекулярну циклізацію сполуки (59) та сполуки (60) з використанням відповідної основи, такої як гідрид натрію, у розчиннику, такому як DMF.

15

Схема 14

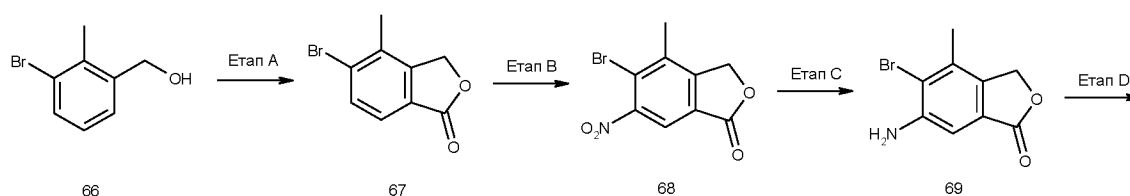


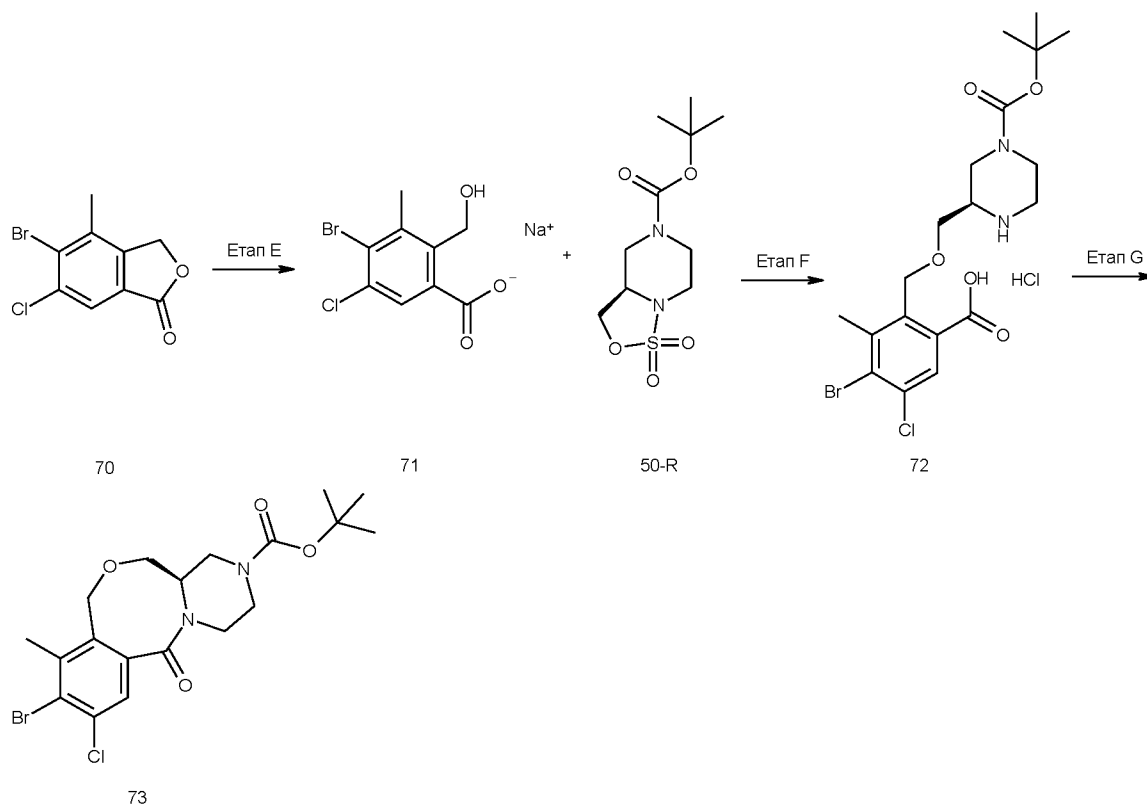
20

Стадію А Схеми 14 виконують методом, по суті аналогічним методу на етапі А Схеми 13, для одержання сполуки (63). Етап В складається з циклізації сполуки (63) методом, по суті аналогічним методу на етапі В Схеми 13, з подальшим метилюванням йодистим метилом. Сполуки (64) і (65) відновлюють після цього етапу.

25

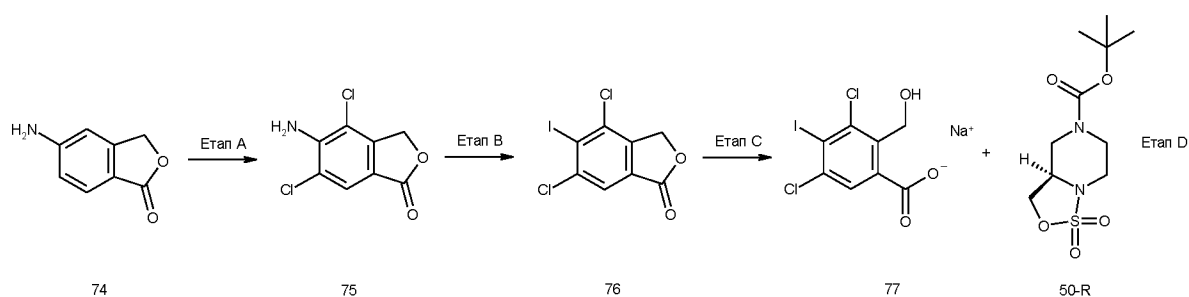
Схема 15

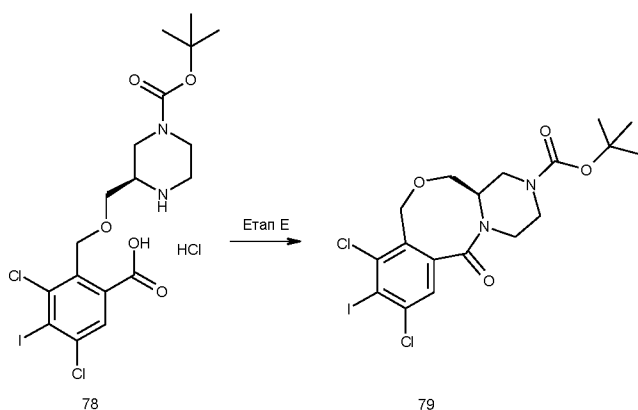




На Схемі 15, етап А, зображена циклізація сполуки (66) шляхом оброблення трифторацетатом талію (III) в TFA з подальшим додаванням оксиду магнію, хлориду літію та MeOH з каталізатором, таким як хлорид паладію (II), в атмосфері монооксиду вуглецю для одержання сполуки (67). Етап В показує нітрування сполуки (67) з використанням нітрату калію в концентрованій сірчаній кислоті для одержання сполуки (68). На етапі С показано гідрування нітрогрупи на сполуці (68) з використанням Pt/C в системі розчинників, таких як DCM і TFA, для одержання сполуки (69). Етап D показує реакцію Зандмейєра, умови якої відомі фахівцю в цій галузі, для перетворення азоту аніліну сполуки (69) на хлор для одержання сполуки (70). Етап Е зображує гідроліз сполуки (70) з використанням прийнятної основи, такої як водний розчин NaOH, з нагріванням для одержання сполуки (71). На етапі F показано алкілування сполуки (71) сполукою (50-R) з використанням прийнятної основи, такої як NaNH, у системі розчинників, таких як DMF та THF, для одержання сполуки (72). Етап G зображує внутрішньомолекулярне амідне сполучення в сполуці (72) з використанням HATU та відповідної основи, такої як DIEA, у розчиннику, такому як DMF, для одержання сполуки (73).

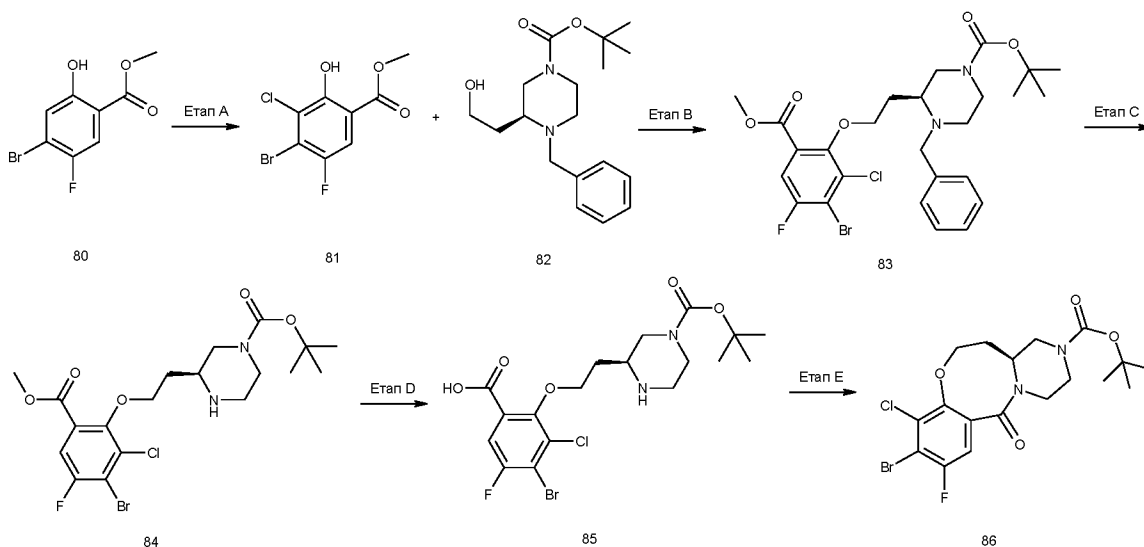
Схема 16





Етап А Схеми 16 виконують методом, по суті аналогічним методу на етапі А Схеми 6, для одержання сполуки (75). Етап В показує реакцію Зандмейєра, умови якої відомі фахівцю в цій галузі, для перетворення азоту аніліну сполуки (75) на йод для одержання сполуки (76). Етапи С-Е виконуються методом, по суті аналогічним методу на етапах Е-Г Схеми 15, для одержання сполуки (77-79).

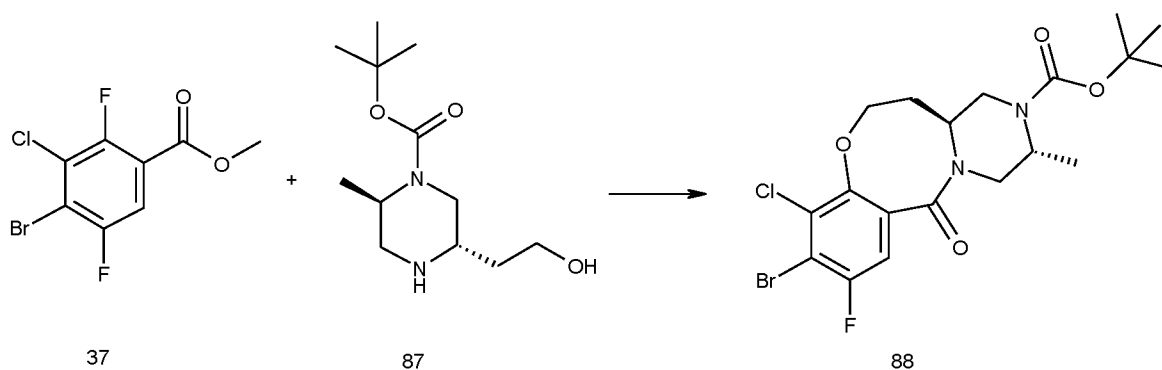
Схема 17



На Схемі 17, етап А, зображено хлорування сполуки (80) відповідною хлорувальною сполукою, такою як NCS, у відповідному розчиннику, такому як оцтова кислота, з нагріванням для одержання сполуки (81). Етап В зображує реакцію Міцунобу між сполукою (81) і сполукою (82) з використанням трифенілфосфіну та діізопропілазодикарбоксилату в розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (83).

Етап С показує дебензилювання сполуки (83) з використанням діізопропіламіну та 1-хлоретилхлорформіату у відповідному розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки (84). Етап D зображує основний гідроліз складного ефіру на сполуці (84) з використанням відповідної основи, такої як гідроксид літію, в системі розчинників, таких як THF і вода, для одержання сполуки (85). На етапі Е зображено внутрішньомолекулярне амідне сполучення сполуки (85) з використанням пропілфосфонового ангідриду з прийнятною основою, такою як TEA, у розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки (86).

Схема 18

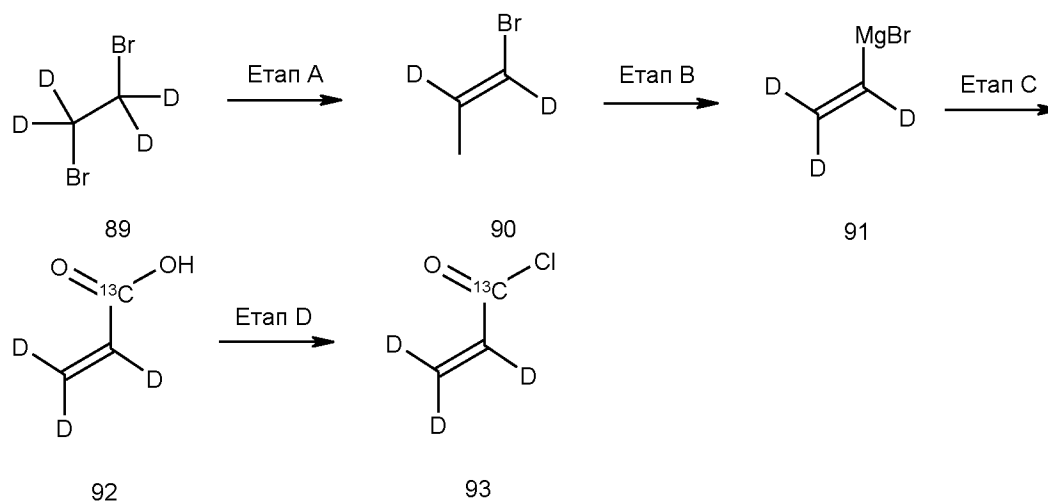


5

На Схемі 18 показано сполучення сполуки (37) і сполуки (87), і подальша циклізація для одержання сполуки (88) з використанням відповідної основи, такої як карбонат цезію, у розчиннику, такому як DMF, для нагрівання.

10

Схема 19

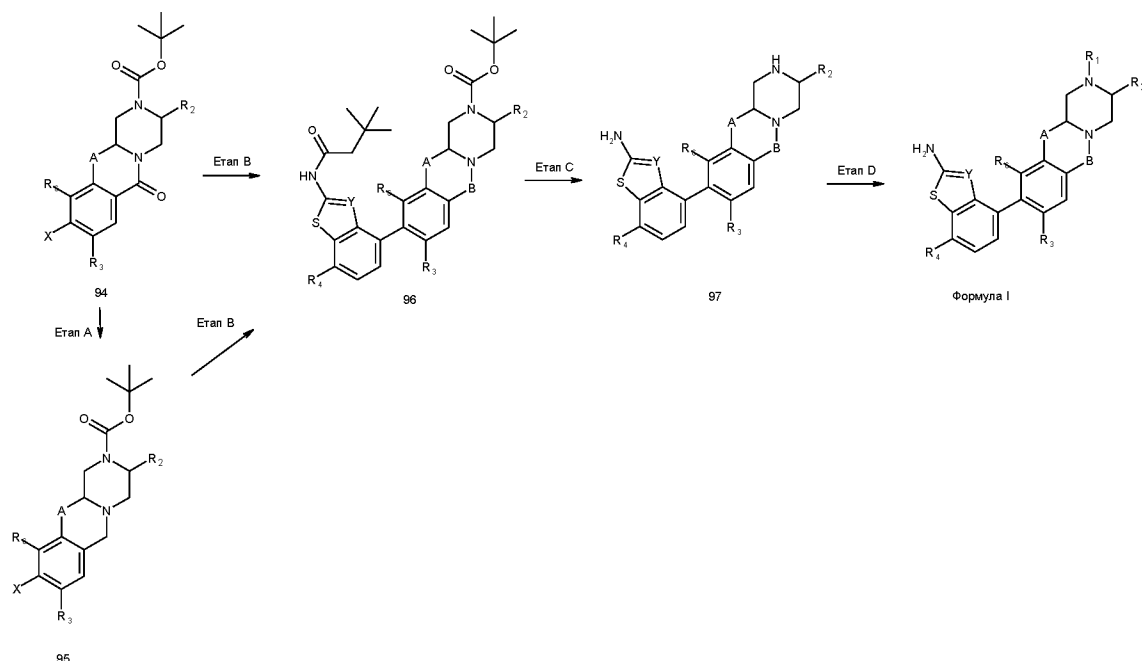


15

Етап А Схеми 19 показує перетворення сполуки (89) на сполуку (90) шляхом оброблення прийнятною основою, такою як KOH, у системі розчинників, таких як дейтерований EtOH у D_2O .
 Етап В зображує реакцію Грін'єра сполуки (90) з магнієм у розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (91). Карбоксилювання сполуки (91) за допомогою $^{13}\text{CO}_2$ в розчиннику, такому як THF, для одержання сполуки (92) показано на етапі С. Етап D показує реакцію сполуки (92) з оксалілхлоридом у розчиннику, такому як DCM з каталітичним DMF для одержання сполуки (93).

20

Схема 20



- 5 На Схемі 20 сполука (94) зображає трициклічні ядра, описані на Схемах 13-18. На стадії А амід у сполуці (94) відновлюють з використанням прийнятного відновника, такого як борандиметилсульфідний комплекс у THF, для одержання сполуки (95). Сполука (94) і сполука (95) можуть бути піддані реакції перехресного сполучення Сузукі з боронатами, як описано на
- 10 Схемах 1-5, з використанням прийнятного каталізатора, такого як дихлорид 1,1'-біс(ди-трет-бутилфосфіно)фероценпаладію, з прийнятною основою, такою як ортофосфат калію, в системі розчинників, такий як 1,4-діоксан і вода, для нагрівання для одержання сполуки (96). Як альтернатива, це сполучення можна здійснити з використанням прийнятного каталізатора, такого як DPEPhosPdCl₂, з основою, такою як карбонат цезію, у розчиннику, такому як толуол, для нагрівання. Фахівцю у цій галузі зрозуміло, що існує багато комбінацій каталізатора, основи та розчинника, які можна використовувати для здійснення такого типу перетворення. Етап С показує кислотне зняття захисту сполуки (96) з використанням кислоти, такої як TFA, у розчиннику, такому як DCM, для одержання сполуки (97). Етап D показує сполучення сполуки (97) і партнера для одержання сполук Формули I. Партнером може бути хлорангідрид, карбонова кислота або ціаногенбромід. У випадках із хлорангідридом використовували відповідну основу, така як TEA або DIEA, у розчиннику, такому як DCM. Хлорангідрид також можна використовувати з карбонатом калію як основою у двофазній системі розчинників, такий як EtOAc, THF і вода. У випадках, коли партнером є карбонова кислота, умови включають прийнятний сполучний реагент, такий як ангідрид пропілфосфонової кислоти, з відповідною основою, такою як DIEA, у розчиннику, такому як DMF. Якщо партнером є ціаногенбромід, прийнятну основу, таку як водний розчин NaOH, використовують у розчиннику, такому як DCM.

Препаративні методики та Приклади

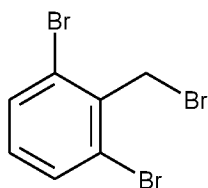
- Наведені нижче Препаративні методики та Приклади додатково ілюструють цей винахід і являють собою типовий синтез сполук за цим винаходом, але їх не слід тлумачити як обмеження обсягу винаходу будь-яким чином. Реагенти та початкові матеріали є легкодоступними або можуть бути легко синтезовані або за відомими процедурами, або з використанням різних модифікацій, які можуть бути зроблені фахівцем у цій галузі.

- Сполуки можуть бути охарактеризовані із застосуванням рідинної хроматографії/мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням (LC-ES/MS), виконаної на системі рідинної хроматографії Agilent HP 1100. Мас-спектрометричні вимірювання з іонізацією електророзпиленням (зроблені в позитивному та/або негативному режимі) виконували на квадрупольному мас-спектрометрі з мас-селективним детектором, підключеним до HP1100 HPLC. Умови LC-MS (низький pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C-18 2,1×50 мм 3,0 мкм; градієнт: 5-100 % В протягом 3 хв, потім 100 % В протягом 0,75 хв, температура колонки: 50±10 °C; швидкість потоку: 1,2 мл/хв; Розчинник А: деіонізована вода з 0,1 % HCOOH; Розчинник В: ACN з 0,1 % мурашиної кислоти; довжина хвилі 214 нм. Альтернативні умови LC-

MS (високий pH): колонка: WATERS™ XTERRA® MS C-18, 2,1×50 мм, 3,5 м; градієнт: 5 % розчинника А протягом 0,25 хв, градієнт від 5 % до 100 % розчинника В протягом 3 хв і 100 % розчинника В протягом 0,5 хв, або від 10 % до 100 % розчинника В протягом 3 хв і 100 % розчинника В протягом 0,75 хв; температура колонки: 50±10 °С; швидкість потоку: 1,2 мл/хв;
 5 Розчинник А: 10 мМ NH₄HCO₃ pH 9; Розчинник В: ACN; довжина хвилі: 214 нм.

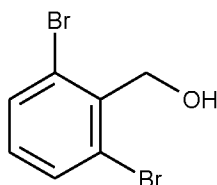
Препаративну хроматографію з оберненою фазою проводили на апараті Agilent 1200 LC-ES/MS, обладнаному мас-спектрометром із мас-селективним детектором і автосамплером/колектором фракцій LEAP Technologies. Методи з високим pH проводили на колонці PHENOMENEX® GEMINI®-NX, 75×30 мм, з розміром частинок 5 мкм, з передколонкою 10×20 мм. Швидкість потоку 85 мл/хв. Елюентом є 10 мМ розчин бікарбонату амонію (pH 10) в ACN.
 10

Препаративна методика 1
 1,3-Дибром-2-(бромметил)бензол



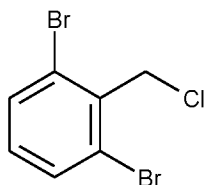
NBS (35,0 г, 195 ммоль) додавали до розчину 2,6-дибромтолуолу (50,0 г, 194 ммоль) у чотирьохлористому вуглеці (500 мл). Суміш нагрівали до 80 °С, і додавали AIBN (3,20 г, 19,1 ммоль). Суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 16 год. Після збігання цього часу суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, і фільтрували. Фільтрат розбавляли EtOAc, і промивали водою, насиченим водним розчином бікарбонату натрію та насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічні речовини сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок сушили у високому вакуумі для одержання вказаної в заголовку сполуки (67,5 г, 84 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,58 (2H, d), 7,04 (1
 20 H, t), 4,86 (2H, s).

Препаративна методика 2
 (2,6-Дибромфеніл)метанол



Боргідрид натрію (7,83 г, 207 ммоль) додавали трьома порціями з інтервалом в 10 хв до розчину 2,6-дибромбензальдегіду (148,7 г, 552,3 ммоль) в EtOH (1,4 л) при перемішуванні при 0 °С. Після останнього додавання суміш перемішували протягом 30 хв перед обережним гасінням насиченим водним розчином NH₄Cl (600 мл). Додавали DCM (1,75 л) і воду (200 мл), і шари розділяли. Водний шар додатково екстрагували з використанням DCM. Об'єднані органічні речовини сушили над сульфатом натрію, і фільтрували через шар діоксиду кремнію, промиваючи EtOAc (2×500 мл). Фільтрат концентрували in vacuo, розчиняли у толуолі, та знову концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (148,7 г, 99 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,66 (2H, d), 7,17 (1H, t), 5,20 (1H, t), 4,74 (2H, d).
 30

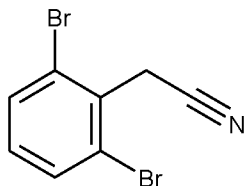
Препаративна методика 3
 1,3-Дибром-2-(хлорметил)бензол



До розчину (2,6-дибромфеніл)метанолу (199,3 г, 749,4 ммоль) у DCM (1,5 л), обробленому DMF (0,5 мл), при 0 °С краплями протягом 1 год. додавали тіонілхлорид (160 мл, 2196 ммоль). Після збігання цього часу суміш витримували для нагрівання до температури навколишнього середовища, після чого нагрівали до 50 °С протягом ночі. Нагрівання припиняли, і реакційну суміш охолоджували до 0 °С перед обережним гасінням водою (500 мл). Суміш розбавляли DCM, і шари розділяли. Органічні речовини промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, водою і знову насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічні речовини сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacua для одержання вказаного в заголовку продукту у вигляді білої твердої речовини (206,98 г, 95 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,75 (2H, d), 7,26 (1H, t), 4,95 (2H, s).

Препаративна методика 4

2-(2,6-Дибромфеніл)ацетонітрил



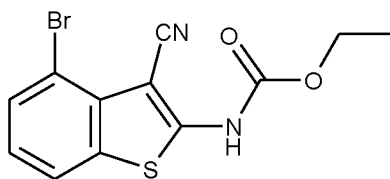
Суміш 1,3-дибром-2-(бромметил)бензолу (57,0 г, 137 ммоль) і ціаніду калію (28,0 г, 417 ммоль) в EtOH (350 мл) і воді (90 мл) кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 5 год. Потім суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, і концентрували in vacua. Залишок розчиняли в EtOAc, і промивали насиченим розчином бікарбонату натрію. Водну фазу екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти промивали водою і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacua. Одержаний залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 10-100 % DCM/гексану для одержання вказаної в заголовку сполуки (34,5 г, 87 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,62 (2H, d), 7,12 (1H, t), 4,14 (2H, s).

Альтернативна Препаративна методика 4

Ціанід калію (142,2 г, 2183,5 ммоль) додавали до розчину 1,3-дибром-2-(хлорметил)бензолу (206,98 г, 727,83 ммоль) у DMSO (600 мл), і перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 2 днів. Після збігання цього часу суміш виливали у воду з льодом, і перемішували протягом 2 год. для одержання білого осаду. Осад фільтрували, і тричі промивали водою перед висушуванням у вакуумній печі. Одержану тверду речовину очищали хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи 10-70 % DCM/гексанів, для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (189,23 г, 94 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,78 (2H, d), 7,28 (1H, t), 4,22 (2H, s).

Препаративна методика 5

Етил-N-(4-бром-3-ціанобензотіофен-2-іл)карбамат



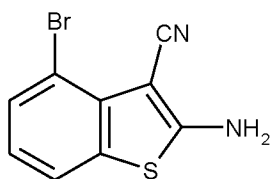
Розчин 2-(2,6-дибромфеніл)ацетонітрилу (20,0 г, 71,3 ммоль) у DMF (200 мл) охолоджували до 0 °С. Порціями додавали гідрид натрію (60 % (мас.) в парафіновому маслі) (2,85 г, 71,3 ммоль). Після завершення додавання суміш перемішували при 0 °С протягом 10 хв, потім краплями додавали етоксикарбонілізотіоціанат (8,60 мл, 71,4 ммоль) при 0-5 °С. Після завершення додавання суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 1 год., потім гріли при 100 °С протягом 4 год. Після збігання цього часу розчинник випарювали in vacua. Залишок перемішували у суміші EtOAc і насиченого розчину бікарбонату натрію. Одержаний осад відфільтровували, промивали водою, і сушили у вакуумній печі при 60-65 °С протягом ночі для одержання вказаної в заголовку сполуки (10,5 г, 45 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 322,8/324,8 [M-H]⁻.

Альтернативна Препаративна методика 5

Гідрид натрію (60 % (мас.) у парафіновому маслі) (24,85 г, 621,3 ммоль) суспендували у DMF (500 мл), і охолоджували до 0 °С. До холодної суспензії краплями додавали розчин 2-(2,6-дибромфеніл)ацетонітрилу (169,14 г, 615,19 ммоль) у DMF (600 мл) протягом 1 год. таким чином, щоб температура не підвищувалась вище 7 °С. Через 30 хв додавали етоксикарбонілізотіоціанат (77,81 мл, 646,0 ммоль) протягом 30 хв, все ще при 0 °С. Суміш перемішували при 0 °С протягом 10 хв, перш ніж знімати з льодяної бані, і додатково перемішували ще протягом 20 хв. Після збігання цього часу додавали L-пролін (14,16 г, 123,0 ммоль) та йодид міді (11,71 г, 61,49 ммоль), і суміш нагрівали до 65 °С протягом 4,5 год. Суміш обробляли 0,5 М водним розчином EDTA (4 л), розбавленим EtOAc (1,6 л), і енергійно перемішували протягом ночі. Після збігання цього часу одержану каламутну суспензію фільтрували, і зібрану тверду речовину промивали водою та EtOAc. Тверду речовину висушували *in vacuo* протягом 1,5 год., потім додатково сушили у вакуумній печі протягом 2 год. для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (187,24 г, 77 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 11,76 (1H, s), 8,01 (1H, d), 7,65 (1H, d), 7,27 (1H, t), 4,90 (2H, q), 1,31 (3H, t).

Препаративна методика 6

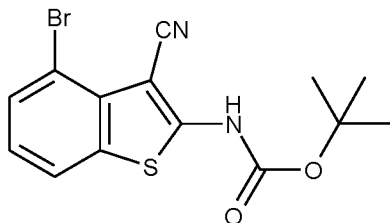
2-Аміно-4-бромбензотіофен-3-карбонітрил



5 н. NaOH (765 мл, 3825 ммоль) додавали до розчину етил-N-(4-бром-3-ціанобензотіофен-2-іл)карбамату (155 г, 476,6 ммоль) у DMSO (480 мл). Суміш нагрівали до 125 °С протягом ночі. Після збігання цього часу нагрівання припиняли, реакційну суміш виливали у воду з льодом (4,2 л), і енергійно перемішували протягом 10 хв. Утворювався осад, який відфільтровували, промивали водою, і сушили у вакуумній печі протягом 2 днів для одержання вказаного в заголовку продукту у вигляді жовтої твердої речовини (73,6 г, 61 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,96 (2H, s), 7,70 (1H, d), 7,46 (1H, d), 7,02 (1H, t).

Препаративна методика 7

трет-бутил-N-бром-3-ціанобензотіофен-2-іл)карбамат



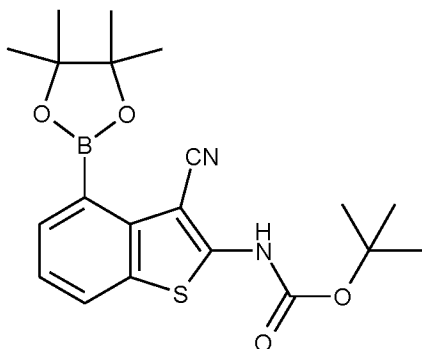
Розчин 2-аміно-4-бромбензотіофен-3-карбонітрилу (20 г, 79,2 ммоль), DIEA (21 мл, 120 ммоль) і DMAP (800 мг, 6,55 ммоль) у THF (270 мл) і DMF (40 мл) обробляли ди-трет-бутилдикарбонатом (19,6 г, 87,1 ммоль). Суміш перемішували в атмосфері азоту при температурі навколишнього середовища протягом 18 год. Реакційну суміш розбавляли водою, розчином бікарбонату натрію та EtOAc, потім перемішували протягом 10 хв. Одержаний осад відфільтровували, промивали холодним EtOAc, і сушили у вакуумній печі при 60 °С протягом ночі для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді бежевої твердої речовини (10,8 г, 38,6 %). Далі фільтрат двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти промивали водою і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували *in vacuo*. Одержаний залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 20-100 % DCM/гексану, для одержання додаткової кількості сполуки (12,5 г, 45 %), що давало загальний вихід 23,3 г (83 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 351/353 [M-H]⁻.

Альтернативна Препаративна методика 7

До розчину 2-аміно-4-бромбензотіофен-3-карбонітрилу (74,5 г, 294 ммоль) у THF (2 л) додавали спочатку DIEA (77 мл, 441 ммоль) і DMAP (2 г, 16 ммоль), після чого ди-трет-бутилдикарбонат (73,1 г, 325 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Після збігання цього часу суміш розбавляли водою, EtOAc і

насиченим водним розчином бікарбонату натрію, який потім фільтрували для одержання не зовсім білої твердої речовини. Цю тверду речовину промивали водою та EtOAc, потім сушили протягом ночі для одержання вказаного у заголовку продукту (32 г, 31 %). Потім шари фільтрату розділяли, і водний шар двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні речовини промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок розчиняли у DCM (260 мл), обробляли ультразвуком, додатково розбавляли гексаном (275 мл), обробляли ультразвуком, розтирали, і фільтрували для одержання додаткової кількості вказаного у заголовку продукту (60,5 г, 58 %) і загального виходу 92,5 г (89 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 351/353 [M-H].

Препаративна методика 8
трет-Бутил-N-[3-ціано-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)бензотіофен-2-іл]карбамат



Розчин трет-бутил-N-(4-бром-3-ціанобензотіофен-2-іл)карбамату (10,90 г, 30,7 ммоль), біс(пінаколато)дибору (23,50 г, 92,54 ммоль) та ацетату калію (9,05 г, 92,2 ммоль) в 1,4-діоксані (150 мл) барботували азотом при 50 °C протягом 30 хв. У колбу завантажували 1,1'-біс(діізопропілфосфіно)фероцен (2,25 г, 5,38 ммоль) та ацетат паладію (0,700 г, 3,12 ммоль), після чого нагрівали при 100 °C в атмосфері азоту. Через 2 год. суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, розбавляли EtOAc, фільтрували через діатомову землю, і промивали EtOAc. Фільтрат обробляли силікагелем (150 г), концентрували насуху, після чого завантажували у картридж. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 0-50 % DCM/гексану, для одержання вказаної в заголовку сполуки (9,15 г, 67 %). ES/MS m/z: 399,2 (M-H).

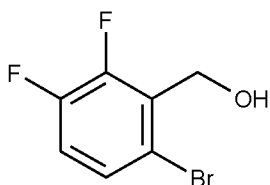
Альтернативна Препаративна методика 8

1,4-діоксан (500 мл) нагрівали зі зворотним холодильником при барботуванні азотом протягом 1 год. Потім температуру знижували до 80 °C, продовжуючи барботування азотом. При цій температурі додавали трет-бутил-N-(4-бром-3-ціанобензотіофен-2-іл)карбамат (32 г, 90,59 ммоль), біс(пінаколато)дибор (60 г, 236 ммоль), ацетат калію (26,67 г, 271,8 ммоль) і, нарешті, ацетат паладію (2,03 г, 9,04 ммоль) і біс(2-дифенілфосфінофеніл)ефір (8,54 г, 15,9 ммоль). Суміш гріли при 100 °C протягом 3 год. Після збігання цього часу нагрівання припиняли, і суміш розбавляли EtOAc, фільтрували через діатомову землю, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок розчиняли у DCM, обробляли 200 г кремнезему, та концентрували in vacuo. Цей діоксид кремнію поміщали у заповнену колонку, і матеріал очищали хроматографією на силікагелі, елюючи 10-95 % DCM і попередньо змішаним 95 % розчином DCM/EtOAc.

Одержані фракції розділяли на основі відносної чистоти. Кожен набір окремо концентрували in vacuo, обробляли ультразвуком в гептанах, розтирали, фільтрували, і промивали гептанами. Одержані тверді речовини сушили протягом ночі, потім об'єднували для одержання вказаної в заголовку сполуки (23,86 г, 65 %). ^1H ЯМР (DMSO- d_6) δ 11,32 (1H, s), 8,02 (1H, d), 7,59 (1H, d), 7,34 (1H, t), 1,53 (9H, s), 1,37 (12H, s).

Препаративна методика 9

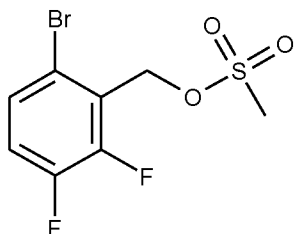
6-Бром-2,3-дифторбензолметанол



6-бром-2,3-дифторбензальдегід (20,0 г, 88,7 ммоль) розчиняли у MeOH (250 мл), і порціями додавали боргідрид натрію (6,70 г, 177 ммоль). Після охолодження екзотермічної реакції до температури навколишнього середовища (~1 год.) реакційну суміш виливали у насичений розчин хлориду амонію, та тричі екстрагували DCM. Об'єднані органічні екстракти промивали водою і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок сушили у високому вакуумі протягом ночі для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (19,5 г, 97 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,37 (1H, m), 7,07 (1H, m), 4,88 (2H, m), 2,13 (1H, m).

Препаративна методика 10

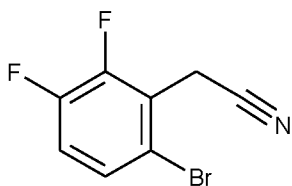
(6-Бром-2,3-дифторфеніл)метилметансульфонат



6-Бром-2,3-дифторбензолметанол (19,5 г, 85,7 ммоль) розчиняли у THF (200 мл), і додавали DIEA (18,0 мл, 103 ммоль). Суміш охолоджували до 0 °С, після чого обробляли метансульфоновим ангідридом (17,1 г, 94,2 ммоль). Після перемішування при температурі навколишнього середовища протягом 18 год. суміш розбавляли EtOAc метил-трет-бутиловим простим ефіром (1:1), і промивали холодною водою. Шари розділяли, і водний шар двічі екстрагували EtOAc:метил-трет-бутиловим простим ефіром (1:1). Об'єднані органічні шари промивали водою і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію і карбонатом калію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтого масла (26,0 г, 99+%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,44 (1H, m), 7,18 (1 H, m), 5,43 (2H, d), 3,12 (3H, s).

Препаративна методика 11

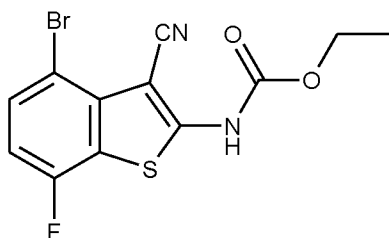
2-(6-бром-2,3-дифторфеніл)ацетонітрил



Суміш (6-бром-2,3-дифторфеніл)метилметансульфонату (26,0 г, 82,0 ммоль) і ціаніду калію (6,06 г, 90,3 ммоль) в EtOH (200 мл) і воді (40,0 мл) кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 30 хв, після чого охолоджували до температури навколишнього середовища. Розчинник видаляли in vacuo, і залишок суспендували у DCM. Суміш промивали водою, насиченим розчином бікарбонату натрію та насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічні речовини сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи 10-100 % DCM/гексану, для одержання вказаної в заголовку сполуки (17,9 г, 94 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,44 (1H, m), 7,15 (1H, m), 3,91 (2H, d).

Препаративна методика 12

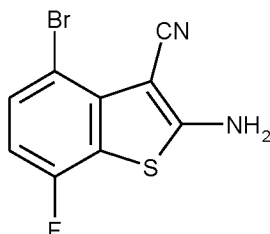
Етил-N-(4-бром-3-ціано-7-фторбензотіофен-2-іл)карбамат



Розчин 2-(6-бром-2,3-дифторфеніл)ацетонітрилу (17,9 г, 77,2 ммоль) у DMF (200 мл) охолоджували на льодяній бані, після чого обробляли порціями трет-бутоксиду калію (9,30 г, 81,2 ммоль). Після завершення додавання суміш перемішували протягом 10 хв (реакційна суміш набувала темно-червоного кольору), і краплями додавали етоксикарбонілізотіоціанат (9,80 мл, 81,4 ммоль). Реакційну суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 1 год., після чого нагрівали при 100 °С протягом 30 хв. Потім суміш охолоджували на крижаній бані протягом 10 хв, і повільно з перемішуванням додавали воду (500 мл). Одержаний осад відфільтровували, промивали водою та гексанами, і сушили на повітрі. Тверду речовину далі сушили у вакуумній печі при 60 °С протягом ночі для одержання вказаної в заголовку сполуки (24,5 г, 84 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 340,8/342,8 [M-H]⁻.

Препаративна методика 13

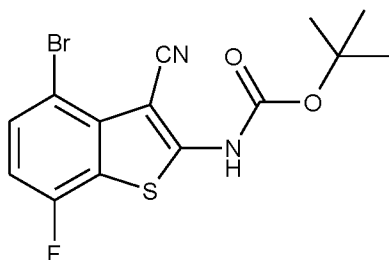
2-Аміно-4-бром-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил



Суміш етил-N-(4-бром-3-ціано-7-фторбензотіофен-2-іл)карбамату (24,5 г, 71,4 ммоль), DMSO (100 мл) і 5 н. NaOH (80,0 мл, 400 ммоль) кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 4 год. Суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, і обробляли холодною водою при інтенсивному перемішуванні. Одержаний осад відфільтровували, промивали водою, і сушили у вакуумній печі при 65 °С протягом ночі для одержання вказаної в заголовку сполуки (15,5 г, 80 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 268,8/270,8 [M-H]⁻.

Препаративна методика 14

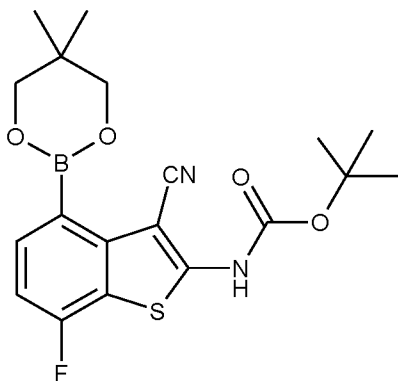
трет-Бутил-N-(4-бром-3-ціано-7-фторбензотіофен-2-іл)карбамат



Вказану в заголовку сполуку одержували з 2-аміно-4-бром-7-фторбензотіофен-3-карбонітрилу за методом по суті аналогічним методу Препаративної методики 7. ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 314,8/316,8 LM-t-Bu+H]⁺.

Препаративна методика 15

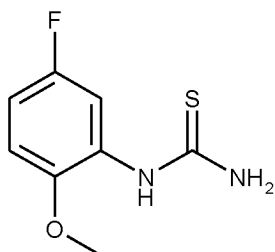
трет-Бутил-N-[3-ціано-4-(5,5-диметил-1,3,2-діоксаборинан-2-іл)-7-фторбензотіофен-2-іл]карбамат



трет-Бутил-N-(4-бром-3-ціано-7-фторбензотіофен-2-іл)карбамат (16,0 г, 41,4 ммоль) і біс(неопентилгліколат)дибор (37,0 г, 157 ммоль) розчиняли в 1,4-діоксані (300 мл) в атмосфері азоту. Додавали ацетат калію (12,2 г, 124 ммоль), і суміш барботували азотом протягом 1 год. при 50 °С. Додавали DPEPhosPdCl₂ (3,0 г, 4,2 ммоль), і колбу нагрівали при 95 °С протягом 1 год. Потім суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, концентрували in vacuo до ~100 мл, розбавляли гептаном (200 мл), перемішували протягом 10 хв, після чого фільтрували через діатомову землю, промиваючи гептаном і сумішшю гептану:метил-трет-бутилового простого ефіру (1:1). Фільтрат концентрували, розчиняли у мінімальній кількості DCM, і фільтрували через шар силікагелю, промиваючи EtOAc:гептаном (1:1). Фільтрат промивали насиченим розчином хлориду амонію і насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічні речовини сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи сумішшю 5-50 % (20 % ацетону у DCM)/гексану, для одержання вказаної в заголовку сполуки (13,0 г, 78 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 11,6 (1H, s), 7,61 (1H, m), 7,20 (1H, m), 3,78 (4H, s), 1,54 (9H, s), 1,03 (6H, s).

Препаративна методика 16

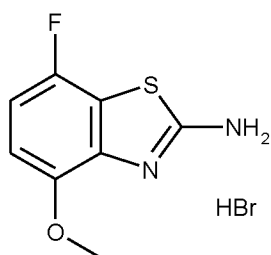
(5-Фтор-2-метоксифеніл)тіосечовина



Бензоїл ізотіоціанат (110 г, 671 ммоль) і THF (875 мл) об'єднували, і охолоджували до 5 °С в атмосфері азоту. Краплями додавали 5-фтор-2-метоксіанілін (83,2 мл, 705 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру реакційної суміші нижче 10 °С. Суміш нагрівали до температури навколишнього середовища, і перемішували протягом 30 хв. Додавали 5 н. NaOH (161 мл, 805 ммоль) та воду (200 мл), і суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 3,5 год. Після збігання цього часу додавали воду (500 мл) та ізопропілацетат (800 мл), і суміш охолоджували до температури навколишнього середовища. Додавали концентрований водний розчин HCl для доведення pH до ~9-10. Шари відокремлювали. Органічний шар сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. До залишку додавали EtOAc (360 мл) та гексани (840 мл), і суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 5 хв. Після збігання цього часу суміш охолоджували до -20 °С, і відстоювали протягом ночі. Одержану тверду речовину відфільтровували, і зібрану тверду речовину промивали холодним гексаном для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді безбарвної твердої речовини (118 г, 88 %). ES/MS m/z: 201 (M+H).

Препаративна методика 17

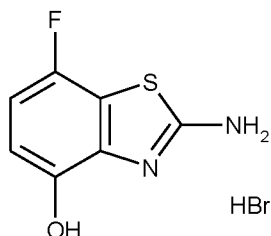
Гідробромід 7-фтор-4-метокси-1,3-бензотіазол-2-аміну



Розчин (5-фтор-2-метокси-феніл)тіосечовини (118 г, 571 ммоль) і CHCl_3 (2 л) охолоджували до 5°C в атмосфері азоту. Краплями додавали бром (30,1 мл, 582 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру реакційної суміші нижче 7°C . Суміш перемішували при 0°C протягом 30 хв перед нагріванням зі зворотним холодильником протягом 2,25 год. Після збігання цього часу суміш охолоджували до -20°C , і відстоювали протягом ночі. Одержану тверду речовину відфільтровували, і промивали холодними гексанами для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтої твердої речовини (141 г, 89 %). ES/MS m/z : 199 ($\text{M}+\text{H}$).

Препаративна методика 18

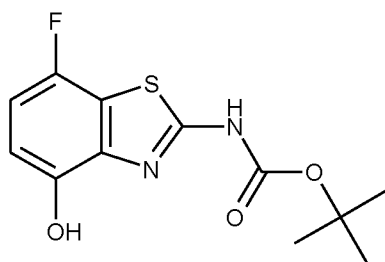
Гідробромід 2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-олу



BBr_3 (150 мл, 1589 ммоль) додавали через канюлю до DCM (1,5 л) при 0°C в атмосфері азоту. Гідробромід 7-фтор-4-метокси-1,3-бензотіазол-2-аміну (141 г, 506 ммоль) додавали порціями протягом 15 хв, і реакційну суміш витримували з повільним нагріванням до температури навколишнього середовища та при перемішуванні протягом ночі. Суміш охолоджували до 0°C , і обережно гасили MeOH , підтримуючи внутрішню температуру нижче 10°C . Під час гасіння вихідним газом барботували холодний 5 н. розчин NaOH . Одержану тверду речовину фільтрували, і промивали холодним DCM для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді безбарвної твердої речовини (117 г, 87 %). ES/MS m/z : 185 ($\text{M}+\text{H}$).

Препаративна методика 19

трет-Бутил (7-фтор-4-гідрокси-1,3-бензотіазол-2-іл)карбамат

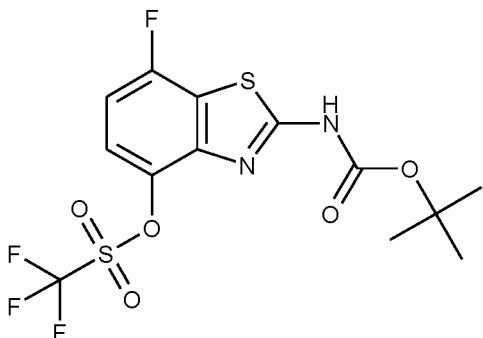


Гідробромід 2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-олу (117 г, 441 ммоль) в 1,4-діоксані (1,5 л) охолоджували до 10°C . Додавали TEA (129 мл, 926 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру реакційної суміші нижче 15°C . Додавали DMAP (2,7 г, 22 ммоль) та ди-трет-бутилдикарбонат (228 г, 1014 ммоль), реакційну суміш повільно нагрівали до температури навколишнього середовища, і перемішували протягом двох днів. Суміш розбавляли водою, EtOAc та насиченим водним розчином хлориду натрію, і шари розділяли. Органічний шар концентрували *in vacuo*. Додавали MeOH (900 мл) та NaOMe (5М в MeOH , 132 мл), і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Додавали додаткову кількість NaOMe (5М в MeOH , 10 мл), і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 3 год. перед концентруванням *in vacuo*. Додавали воду та EtOAc , і шари розділяли. Органічний шар сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і

концентрували in vacuo до утворення твердих речовин. Додавали гексани, одержані тверді речовини фільтрували, і промивали гексанами для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини світло-коричневого кольору (97,2 г, 78 %). ES/MS m/z: 283 (M-H).

Препаративна методика 20

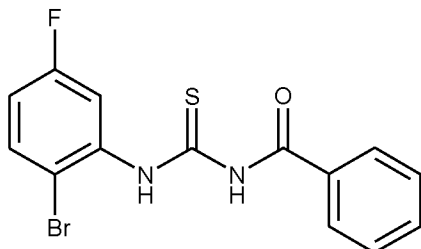
5 2-[(трет-Бутоксикарбоніл)аміно]-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-ілтрифторметансульфонат



10 трет-Бутил-(7-фтор-4-гідрокси-1,3-бензотіазол-2-іл)карбамат (116 г, 407 ммоль), DCM (1,4 л) і піридин (66 мл, 814 ммоль) об'єднували, і охолоджували до 5 °С в атмосфері азоту. Краплями додавали трифторметансульфоновий ангідрид (83 мл, 488 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру реакційної суміші нижче 10 °С. Суміш розбавляли водою, і шари розділяли. Органічний шар промивали 10 % водним розчином лимонної кислоти. Органічний шар сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок очищали нормально-фазовою хроматографією, елюючи градієнтом 25-28 % В в А (А: гексани, В: 25 % DCM в EtOAc), для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтої твердої речовини (123 г, 73 %). ES/MS m/z: 415 (M-H).

Препаративна методика 21

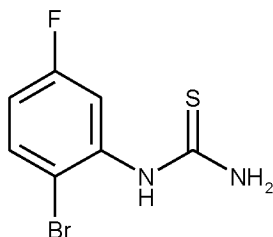
20 N-[(2-Бром-5-фторфеніл)карбамотіоїл]бензамід



25 Розчин 2-бром-5-фтораніліну (250 г, 1289,4 ммоль) у THF (400 мл) перемішували верхньою механічною мішалкою. Бензоїлізотіоціанат (130 г, 780,6 ммоль) у THF (800 мл) додавали протягом 30 хв із застосуванням краплинної лійки. Для підтримання внутрішньої температури нижче 30 °С під час додавання використовували водяну баню. Через 1,5 год. реакційну суміш порівну розливали у три 4-літрові колби з водою (3 л). Одержані тверді речовини відфільтровували під вакуумом через лійку зі спеченим склом. Тверді речовини промивали деіонізованою водою (8 л), і сушили на повітрі під вакуумом для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді коричневої твердої речовини (456 г, 99+%). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 353/355 [M-H]⁻.

Препаративна методика 22

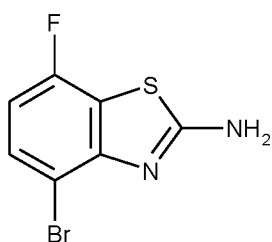
(2-Бром-5-фторфеніл)тіосечовина



До суспензії N-[(2-бром-5-фторфеніл)карбамотіоліл]бензаміду (1600 г, 4,53 моль), THF (6 л) і MeOH (1,6 л) додавали водний 5 н. розчин NaOH (1 л). Після 18 год. перемішування при температурі навколишнього середовища реакційну суміш фільтрували через шар діатомової землі для видалення великодисперсних частинок чорного кольору. Шар діатомової землі промивали THF/MeOH, потім 100 % MeOH. Розчинник видаляли in vacuo для одержання жовтувато-коричневої твердої речовини. До згаданої твердої речовини додавали суміш води з льодом (4 л), та із застосуванням верхньої механічної мішалки додавали 5 н. розчин HCl (-300 мл) порціями по 100 мл для доведення pH до 7. Додавали додаткову кількість суміші води з льодом, і суміш перемішували протягом ~1 год. Додавали воду (4 л), і суспензію фільтрували під вакуумом через велику лійку зі спеченим склом. Тверді речовини промивали деіонізованою водою, і після видалення більшої частини води тверді речовини промивали гексанами (8 л), та сушили на повітрі. Тверді речовини поміщали у вакуумну піч при 50 °C на 24 год. для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді не зовсім білої твердої речовини (1035 г, 92 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 249/251 [M-H]⁻.

Препаративна методика 23

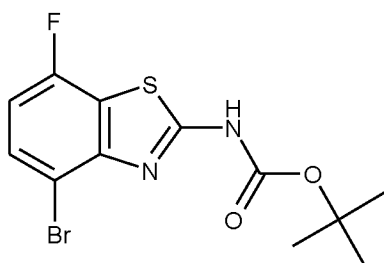
4-Бром-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін



Сірчану кислоту (350 мл), охолоджену на ванні із сумішшю льоду/хлориду натрію, перемішували верхньою механічною мішалкою. Порціями протягом 5 хв додавали (2-бром-5-фторфеніл)тіосечовину (130,5 г, 523,9 ммоль). Через 10 хв внутрішня температура досягала рівня ~1 °C. В атмосфері азоту 8 порціями протягом ~15 хв додавали трибромід піридинію (185 г, 549,53 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру нижче 5 °C. Пару, що утворювалася, барботували через охолоджений на льоду уловлювач з NaOH. Після перемішування при ~0 °C протягом 75 хв реакційну суміш нагрівали до температури навколишнього середовища. Потім реакційну суміш нагрівали до початкової внутрішньої температури 50 °C, після чого поступово нагрівали до 59 °C. Через 1,5 год. реакційну суміш охолоджували до температури навколишнього середовища. Реакційну суміш виливали у велику колбу, яка містила лід. pH обережно доводили до ~7 із застосуванням 18,9 н. NaOH (620 мл). Тверді речовини відфільтровували через лійку зі спеченим склом, і промивали деіонізованою водою доти, доки pH фільтрату не стане відповідати pH деіонізованої води. Тверду речовину сушили на повітрі, потім поміщали у вакуумну піч при ~50 °C на 24 год. для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтувато-коричневої твердої речовини (129,3 г, 99+%). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 247/249 [M+H]⁺.

Препаративна методика 24

трет-Бутил-N-(4-бром-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-іл)карбамат

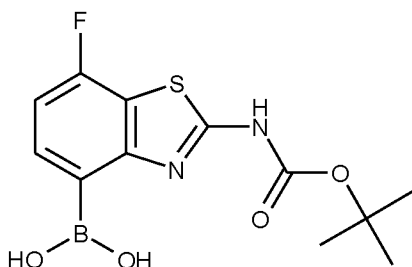


До перемішуваної суспензії 4-бром-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-аміну (370,6 г, 1500 ммоль) і DMAP (36,6 г, 300 ммоль) у DCM (1500 мл) порціями додавали розчин ди-трет-бутилдикарбонату (388 г, 1724 ммоль), розчиненого у DCM (150 мл), через краплинну лійку з такою швидкістю, щоб контролювати виділення газу. Реакційну суміш перемішували при

температурі навколишнього середовища протягом 1 год., після чого додавали додаткову порцію ди-трет-бутилдикарбонату (5,0 г, 23 ммоль). Реакційну суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 30 хв, після чого додавали 10 % водний розчин лимонної кислоти (800 мл), і шари розділяли. Водний шар двічі екстрагували DCM, і об'єднані органічні екстракти один раз промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію. Органічний шар концентрували in vacuo, і до залишку додавали DCM (200 мл) і гексани (1800 мл). Одержану суспензію фільтрували, сушили на повітрі, і зібрану тверду речовину зберігали. Фільтрат концентрували in vacuo, і до залишку додавали MeOH (500 мл) і метоксид натрію (20 мл, 5 н. в MeOH, 100 ммоль). Суміш концентрували in vacuo при 45 °С. До залишку додавали MeOH (500 мл) і 5 н. NaOH (100 мл, 500 ммоль). Суміш концентрували in vacuo при 45 °С. До залишку додавали воду і DCM, і шари розділяли. Водний шар екстрагували один раз DCM. Органічні речовини сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. До залишку додавали 100 мл DCM і 900 мл гексанів, одержану тверду речовину суспендували, фільтрували, сушили на повітрі та об'єднували з одержаною на початку твердою речовиною для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді не зовсім білої твердої речовини (489,55 г, 94 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 290,8/292,8 [M-t-Bu+H]⁺.

Препаративна методика 25

[2-(трет-Бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]боронова кислота



2-[(трет-Бутоксикарбоніл)аміно]-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-ілтрифторметансульфонат (20,0 г, 48,1 ммоль), ацетат калію (14,2 г, 144 ммоль), біс(пінаcolato)дибор (97,7 г, 385 ммоль), тетракіс(трифенілфосфін)паладій (0) (5,55 г, 4,8 ммоль) і 1,4-діоксан (240 мл) об'єднували, і барботували азотом протягом 10 хв. Суміш нагрівали при 80 °С протягом ночі перед охолодженням до температури навколишнього середовища та розведенням водою та EtOAc. Шари відокремлювали. Органічний шар сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Додавали ацетон (500 мл), воду (500 мл) і ацетат амонію (112 г, 1443 ммоль). Після цього додавали NaIO₄ (309 г, 1443 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру реакційної суміші у межах 18-23 °С. Суміш енергійно перемішували при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Після збігання цього часу додавали EtOAc. Суміш перемішували протягом 30 хв, фільтрували через діатомову землю, і шари розділяли. Органічний шар концентрували in vacuo. Водний шар розбавляли насиченим водним розчином хлориду натрію, і двічі екстрагували EtOAc. Ці органічні екстракти об'єднували з попередньо сконцентрованим органічним шаром. Об'єднані екстракти промивали водою, насиченим водним розчином хлориду натрію, водою та насиченим водним розчином бікарбонату натрію. Органічний шар сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок суспендували у гексанах з невеликою кількістю DCM. Одержану тверду речовину фільтрували, і промивали гексанами для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтувато-коричневої твердої речовини (13,4 г, 89 %). ES/MS m/z: 313 (M+H).

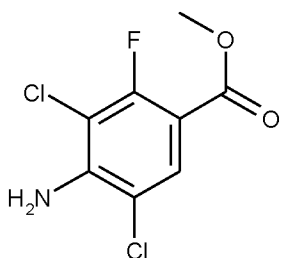
Альтернативна Препаративна методика 25

До суспензії гідриду натрію (60 % у парафіновому маслі) (34,6 г, 865 ммоль) у THF (2000 мл) при внутрішній -17 °С протягом 15 хв додавали розчин трет-бутил-N-(4-бром-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-іл)карбамату (250,18 г, 720,6 ммоль), розчиненого у THF (500 мл), підтримуючи внутрішню температуру протягом додавання у межах від -10 °С до -15 °С. Після додавання суміш перемішували при температурі у межах від -10 °С до -15 °С протягом 15 хв, після чого виділення газу припинялося. Реакційну суміш охолоджували до внутрішньої температури -65 °С, після чого краплями додавали н-бутиллітій (350 мл, 2,5 М у гексані, 875 ммоль) протягом 30 хв з такою швидкістю, щоб підтримувати внутрішню температуру у межах від -60 °С до -65 °С. Після додавання реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 20 хв, після чого краплями протягом 15 хв додавали триізопропілборат (416 мл, 1800 ммоль),

підтримуючи внутрішню температуру нижче -60 °С. Реакційну суміш витримували для нагрівання до внутрішньої температури 0 °С протягом 5 год. 45 хв, після чого обережно додавали насичений водний розчин хлориду амонію (400 мл) для контролю виділення газу. До суміші додавали воду (400 мл) та EtOAc (400 мл), і шари розділяли. До водного шару додавали достатню кількість 1 н. водного розчину HCl для доведення рН до 3-4, після чого водний шар двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. До залишку додавали н-гептан (500 мл), і суміш концентрували in vacuo при 55 °С. До залишку додавали додаткову порцію н-гептану (500 мл), і суміш концентрували in vacuo при 55 °С. До твердого залишку додавали 200 мл DCM і 1800 мл гексанів, і суміш суспендували. Тверду речовину відфільтровували, промивали гексанами, і сушили на повітрі для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді не зовсім білої твердої речовини (217,2 г, 94 %). ES/MS m/z: 313 (M+H).

Препаративна методика 26

Метил-4-аміно-3,5-дихлор-2-фторбензоат



Метил-4-аміно-2-фторбензоат (27,0 г, 160 ммоль) і NCS (46,3 г, 336 ммоль) розчиняли у DMF (300 мл), і нагрівали при 80 °С. Через 40 хв реакційну суміш виливали у суміш води з льодом, і двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти промивали один раз 5 н. NaOH, двічі 0,2 н. водним розчином LiCl, сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки (37,0 г, 97 %). ES/MS m/z (³⁵C1/³⁷C1) 238/240 [M+H]⁺.

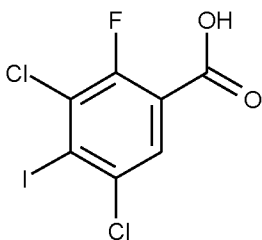
Таблиця 1

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 26

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ЯМР
27		4-Аміно-5-хлор-2,3-дифторбензойна кислота	¹ H ЯМР (DMSO-d ₆) δ 12,96 (s, 1H), 7,54 (dd, J=2,1 Гц, 6,9 Гц, 1H), 6,56 (bs, 2H)
28		Метил-4-аміно-5-хлор-2-фтор-3-метилбензоат	¹ H ЯМР (CDCl ₃) δ 7,80 (d, J=7,2 Гц, 1H), 4,56 (bs, 2H), 3,16 (s, 3H), 2,14 (d, 3H)

Препаративна методика 29

3,5-Дихлор-2-фтор-4-йодбензойна кислота

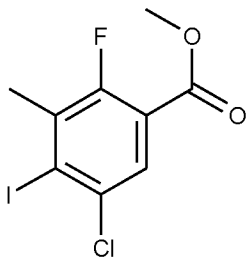


Йодид міді (10,0 г, 51,5 ммоль), ACN (128 мл) і трет-бутилнітрит (13,6 мл, 103 ммоль) об'єднували, і суміш нагрівали при 50 °С протягом 30 хв, після чого до суміші додавали метил-4-аміно-3,5-дихлор-2-фторбензоат (6,11 г, 25,7 ммоль). Відзначалося виділення газу. Через 1 год. 40 хв при 50 °С розчинник видаляли *in vacuo*. Додавали воду, EtOAc і 1 н. водний розчин HCl. Водний шар двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти промивали водним розчином бісульфіту натрію, сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували *in vacuo*. Неочищену суміш очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 3-5 % EtOAc у гексанах. Найчистіші фракції об'єднували, і концентрували *in vacuo* для одержання проміжного хімічного продукту, метилового складного ефіру (5,85 г, 65 %).

До метил-3,5-дихлор-2-фтор-4-йодбензоату (5,85 г, 16,8 ммоль) додавали MeOH (170 мл) і 1 н. водний розчин NaOH (17 мл). У процесі перемішування при температурі навколишнього середовища протягом 40 хв матеріал повністю розчинявся. MeOH видаляли *in vacuo*. До залишку додавали EtOAc і 1 н. водний розчин HCl. Водний шар двічі екстрагували EtOAc, і об'єднані органічні екстракти сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували *in vacuo* для одержання вказаної в заголовку сполуки (5,56 г, 99 %): ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 8,063-8,08 (d, 1H, J=6,34 Гц).

Препаративна методика 30

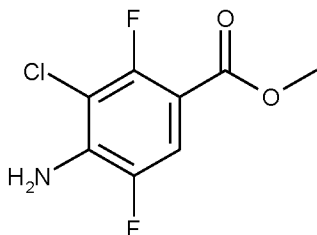
Метил-5-хлор-2-фтор-4-йод-3-метилбензоат



Метил-4-аміно-5-хлор-2-фтор-3-метилбензоат (14,8 г, 68,0 ммоль) в ACN (100 мл) додавали до перемішуваної суміші йодистої міді (15,7 г, 82,4 ммоль), ACN (100 мл) і трет-бутилнітриту (12,3 мл, 103 ммоль). Суміш нагрівали в атмосфері N₂ при 40 °С протягом 18 год. Суміш концентрували *in vacuo* до половини початкового об'єму, розбавляли EtOAc, і двічі фільтрували через діатомову землю. Зібраний фільтрат концентрували *in vacuo*. Неочищену суміш очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи EtOAc у гексанах. Найчистіші фракції об'єднували, і концентрували *in vacuo* для одержання вказаної в заголовку сполуки (22,46 г, 52,8 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,91 (d, J=6,6 Гц, 1H), 3,95 (s, 3H), 2,53 (d, J=3,1 Гц, 3H).

Препаративна методика 31

Метил-4-аміно-3-хлор-2,5-дифторбензоат

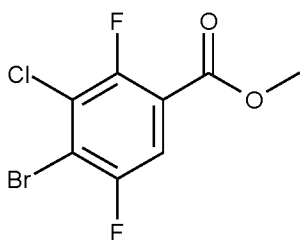


До розчину метил-4-аміно-2,5-дифторбензоату (25 г, 127 ммоль) у DMF (100 мл) додавали NCS (19,9 г, 146 ммоль) при температурі навколишнього середовища, після чого суміш

нагрівали при 45 °С. протягом 18 год. Реакційну суміш виливали у суміш води (1,5 л) та діетилового ефіру (1,2 л) і шари відокремлювали. Водний шар екстрагували діетиловим ефіром (1 л). Об'єднані органічні екстракти промивали холодним 1 н. водним розчином NaOH, водою і насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічні речовини сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи сумішшю 10-30 % (75 % EtOAc в OCM)/гексану для одержання вказаної в заголовку сполуки (24,5 г, 87 %). ES/MS m/z: 222,2 (M+H).

Препаративна методика 32

Метил-4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоат



Метил-4-аміно-3-хлор-2,5-дифторбензоат (24,5 г, 111 ммоль) в ACN (100 мл) додавали до холодної суміші броміду міді (6,2 г, 28 ммоль) і трет-бутилнітриту (20 мл, 168 ммоль) в ACN (100 мл). Суміш зеленого кольору нагрівали до температури навколишнього середовища протягом 18 год. Потім реакційну суміш розбавляли ACN, фільтрували через шар діатомової землі, та промивали DCM. Фільтрат концентрували, і розбавляли DCM, знову фільтрували через діатомову землю, і промивали DCM. Фільтрат промивали водою, насиченим розчином хлориду амонію (2х), насиченим водним розчином хлориду натрію (2х), сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи сумішшю 0-50 % (10 % EtOAc в DCM)/гексану для одержання вказаної в заголовку сполуки (23,5 г, 70 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,68 (1 H, m), 3,99 (3H, s).

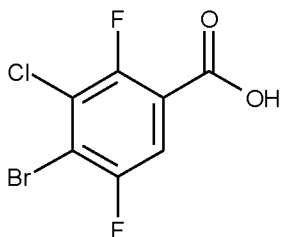
Таблиця 2

Сполука, синтезована методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 32

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ЯМР
33		4-бром-5-хлор-2,3-дифторбензойна кислота	¹ H ЯМР (DMSO-d ₆) δ 7,89 (dd, J=2,2, 6,2 Гц, 1H)

Препаративна методика 34

4-Бром-3-хлор-2,5-дифторбензойна кислота

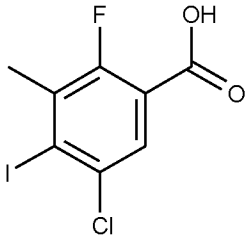


До розчину метил-4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоату (10,8 г, 37,8 ммоль) у THF (100 мл) додавали MeOH (50 мл). Однорідний розчин охолоджували на льодяній бані, і краплями

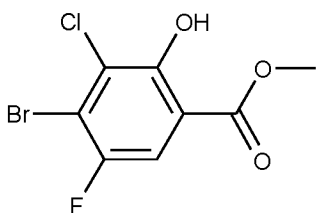
- 5 додавали 2 н. NaOH (60мл, 120 ммоль). Після додавання суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 30 хв. Органічний розчинник видаляли *in vacuo*. Водний розчин охолоджували льодом, і рН доводили до ~2,0 з використанням 5 н. HCl (24 мл). Водний розчин екстрагували EtOAc (3х). Об'єднані органічні екстракти промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували *in vacuo*. Одержаний залишок сушили у вакуумній печі при 60 °C протягом ночі для одержання вказаної в заголовку сполуки (10,3 г, 99 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,81 (dd, J=6,0 Гц, 8,6 Гц, 1H).

Таблиця 3

Сполука, синтезована методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 34

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ЯМР
35		5-хлор-2-фтор-4-йод-3-метилбензойна кислота	¹ H ЯМР (DMSO-d ₆) δ 13,62 (s, 1H), 7,84 (d, J=6,7 Гц, 1H), 2,45 (d, 3H).

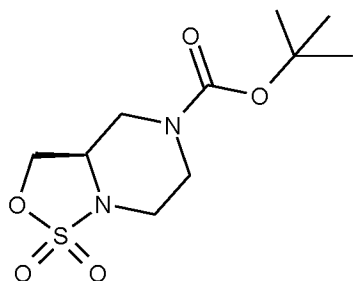
- 10 Препаративна методика 36
Метил-4-бром-3-хлор-5-фтор-2-гідроксибензоат



- 15 До розчину метил-4-бром-5-фтор-2-гідроксибензоату (9 г, 34,3 ммоль) в оцтовій кислоті (70 мл) додавали NCS (14 г, 104,8 ммоль), і суміш нагрівали до 55 °C. Через 18 год. додавали додаткову кількість NCS (5,5 г, 37,7 ммоль), і суміш перемішували протягом 24 год. при 55 °C. Потім реакційну суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, і надлишок оцтової кислоти видаляли *in vacuo*. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи 100 % DCM, для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (7,1 г, 73 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 281/283 [M-H]⁻.
- 20

Препаративна методика 37

трет-Бутил-(3aR)-1,1-діоксо-3a,4,6,7-тетрагідро-3H-оксатіазоло[3,4-a]піразин-5-карбоксилат

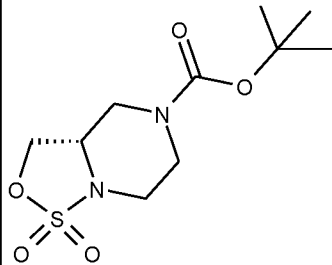


- 25
- 30 До суспензії імідазолу (24,9 г, 362 ммоль) у DCM (181 мл) при 0 °C краплями додавали тіонілхлорид (8,0 мл, 110 ммоль). Суміш перемішували при 0 °C протягом 5 хв і при температурі навколишнього середовища протягом 1 год. Суміш охолоджували до -78 °C, і додавали краплями протягом 45 хв розчин трет-бутил-(3R)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилату (8,00 г, 36,2 ммоль) у DCM (181 мл). Суміш нагрівали до температури навколишнього

середовища, і перемішували протягом 2,5 днів. Реакцію гасили насиченим водним розчином хлориду амонію, і розбавляли водою та DCM. Шари розділяли, і водний шар знову екстрагували DCM. Об'єднані органічні шари промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували *in vacuo* для одержання бурштинового сиропу. До розчину сиропу в ацетонітрилі (282 мл) при 0 °C додавали розчин перйодату натрію (10,2 г, 47,6 ммоль) у воді (92 мл). Додавали хлорид рутенію (III) (76 мг, 0,37 ммоль). Одержану суспензію перемішували при 0 °C протягом 5 хв і при температурі навколишнього середовища протягом 5 год. Реакційну суміш гасили насиченим водним розчином хлориду амонію, і розбавляли водою та EtOAc. Шари розділяли, і водний шар знову екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні шари промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, і фільтрували через фільтрувальний папір, після чого через тонкий шар силікагелю. Фільтрат концентрували *in vacuo*. До залишку додавали DCM. суміш концентрували *in vacuo*, і поміщали у вакуум на ніч для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтувато-коричневої твердої речовини (9,39 г, 93 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 4,63 (1H, dd), 4,23 (1H, t), 4,23 (1H, br s), 4,07 (1H, br s), 3,64 (1H, m), 3,45 (1H, d), 3,13 (1H, m), 2,96 (2H, td), 1,47 (9H, s).

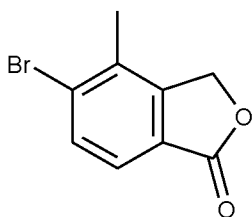
Таблиця 4

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічно методу Препаративної методики 37

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	¹ H ЯМР (COCl ₂)
38		трет-бутил-(3aS)-1,1-діоксо-3a,4,6,7-тетрагідро-3H-оксатіазоло[3,4-а]піразин-5-карбоксилат	4,63 (1H, dd), 4,23 (1H, t), 4,23 (1H, br s), 4,07 (1H, br s), 3,64 (1H, m), 3,45 (1H, d), 3,13 (1H, m), 2,96 (2H, td), 1,47 (9H, s)

Препаративна методика 39

20 5-Бром-4-метил-3H-ізобензофуран-1-он

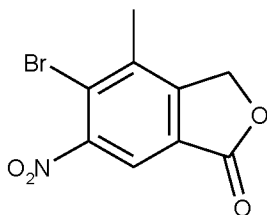


До суспензії (3-бром-2-метилфеніл)метанолу (15,0 г, 73,1 ммоль) у TFA (75 мл) додавали трифторацетат талію (III) (41,8 г, 73,1 ммоль). Додаткову порцію TFA (25 мл) використовували для промивання трифторацетату талію (III) в реакційній посудині. Суміш перемішували в атмосфері азоту при температурі навколишнього середовища протягом ночі, концентрували *in vacuo*, та сушили під вакуумом для одержання світло-коричневої твердої речовини. Тверду речовину поміщали в атмосферу азоту, і об'єднували з оксидом магнію (6,01 г, 149 ммоль), хлоридом літію (6,32 г, 149 ммоль) і MeOH (300 мл). Додавали хлорид паладію (II) (1,32 г, 7,38 ммоль). Суміш п'ять разів продували монооксидом вуглецю, і поміщали в атмосферу монооксиду вуглецю (під тиском газу з еластичної камери). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 2 год., і додавали хлорид паладію (II) (262 мг, 1,46 ммоль) і оксид магнію (1,18 г, 29,2 ммоль). Суміш тричі продували монооксидом вуглецю, і поміщали в атмосферу монооксиду вуглецю (під тиском газу з еластичної камери). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 30 хв, і додавали хлорид паладію (II) (262 мг, 1,46 ммоль) і оксид магнію (1,18 г, 29,2 ммоль). Суміш чотири рази продували монооксидом вуглецю, і поміщали в атмосферу монооксиду вуглецю (під тиском газу

з еластичної камери). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 1,5 год., і додавали хлорид паладію (II) (327 мг, 1,83 ммоль) і оксид магнію (1,77 г, 43,9 ммоль). Суміш продували монооксидом вуглецю, і поміщали в атмосферу монооксиду вуглецю (під тиском газу з еластичної камери). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 1,5 год., фільтрували через діатомову землю, і промивали через діатомову землю EtOAc. Фільтрат концентрували in vacuo для одержання залишку. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 0-30 % EtOAc/гексанів. Фракції, що містили продукт, концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (14,48 г, 70 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 227,0/229,0 [M+H]⁺.

Препаративна методика 40

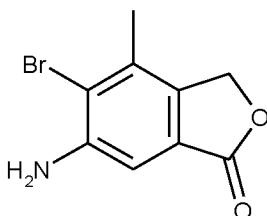
5-Бром-4-метил-6-нітро-3H-ізобензофуран-1-он



Розчин 5-бром-4-метил-3H-ізобензофуран-1-ону (14,4 г, 50,7 ммоль, чистота 80 %) у концентрованій сірчаній кислоті (160 мл) охолоджували до -5 °С, і додавали нітрат калію (9,62 г, 95,2 ммоль). Суміш перемішували в атмосфері азоту протягом 2,5 год., і при перемішуванні додавали лід (750 г). Суміш тричі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні шари промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 10-70 % EtOAc/гексанів. Фракції, що містили продукт, концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини, забарвлену у кольори від не зовсім білого до жовтого/оранжевого (11,98 г, 87 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 289,0/291,0 [M+H]⁺.

Препаративна методика 41

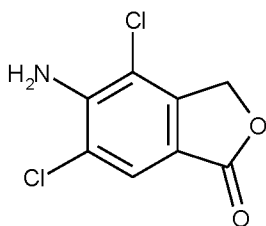
6-Аміно-5-бром-4-метил-3H-ізобензофуран-1-он



У реакційну посудину високого тиску додавали 5-бром-4-метил-6-нітро-3H-ізобензофуран-1-он (11,98 г, 44,04 ммоль), DCM (1000 мл), TFA (300 мл, 4 моль) і платину (5 % на вуглєці, сульфурیزована, 3,00 г, 0,769 ммоль). Суміш продували воднем, і піддавали дії тиску до 45 фунт/дюйм² (0,31 МПа) протягом 1,25 год. Реакційну суміш фільтрували через діатомову землю, і промивали DCM. Фільтрат концентрували in vacuo для одержання залишку. Залишок сушили під вакуумом, і очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 10-60 % EtOAc/DCM. Фракції, що містили продукт, концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини персикового кольору (9,86 г, 96 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 242,0/244,0 [M+H]⁺.

Препаративна методика 42

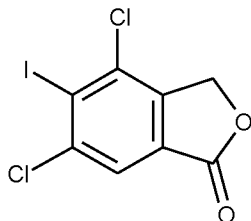
5-Аміно-4,6-дихлор-3H-ізобензофуран-1-он



До розчину 5-аміно-3H-ізобензофуран-1-ону (10,44 г, 68,60 ммоль) у DMF (100 мл) при температурі навколишнього середовища додавали NCS (20,56 г, 150,9 ммоль). Суміш перемішували при 50 °С протягом 2,5 год. і при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Суміш виливали у воду (1 л), і осад відфільтровували через фільтрувальну фритту, двічі промивали водою, після чого діетиловим простим ефіром, і сушили протягуванням повітря через фритту. Осад поміщали в EtOAc, сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтувато-помаранчевої твердої речовини (14,27 г, 93 %). ES/MS m/z (³⁵C1/³⁷C1) 218,2/220,0 [M+H]⁺.

Препаративна методика 43

4,6-Дихлор-5-йод-3H-ізобензофуран-1-он

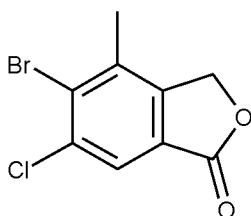


15

До суспензії 5-аміно-4,6-дихлор-3H-ізобензофуран-1-ону (8,00 г, 35,6 ммоль) в ацетонітрилі (237 мл) при -15 °С краплями додавали концентровану сірчану кислоту (6,5 мл, 120 ммоль). Повільно додавали розчин нітриту натрію (4,96 г, 71,2 ммоль) у воді (36 мл). Суміш перемішували при 0С протягом 30 хв. Краплями додавали розчин калію йодиду (23,6 г, 142 ммоль) у воді (36 мл). Суміш перемішували при 0 °С протягом 15 хв і при температурі навколишнього середовища протягом 30 хв. Суміш розбавляли насиченим водним розчином сульфату натрію, і частково концентрували in vacuo для видалення більшої частини ацетонітрилу. Суміш розбавляли EtOAc, і шари розділяли. Органічний шар промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 0-25 % EtOAc/гексанів. Фракції, що містили неочищений продукт, концентрували in vacuo, та додатково очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 100 % DCM. Фракції обох хроматографічних очищень, що містили чистий продукт, об'єднували, концентрували in vacuo, та поміщали у вакуум на ніч для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді блідо-жовтої твердої речовини (6,62 г, 51 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,89 (1H, s), 5,25 (2H, s).

Препаративна методика 44

5-Бром-6-хлор-4-метил-3H-ізобензофуран-1-он



35

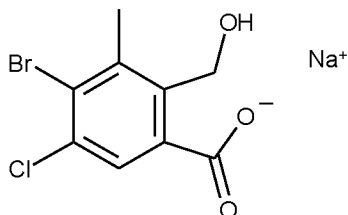
До суспензії хлориду міді (5,85 г, 43,5 ммоль) в ацетонітрилі (150 мл) на бані з охолодженою водою протягом 5 хв додавали трет-бутилнітрит (12,9 мл, 108 ммоль). Суміш перемішували протягом 10 хв, і видаляли баню з охолодженою водою. Суміш додатково перемішували в атмосфері азоту протягом 25 хв. Додавали краплями розчин 6-аміно-5-бром-4-метил-3H-

40

ізобензофуран-1-ону (8,73 г, 36,1 ммоль) в ацетонітрилі (550 мл), і суміш перемішували в атмосфері азоту протягом 1,5 год. Суміш частково концентрували *in vacuo* для зменшення об'єму до приблизно до 275 мл. Суміш розбавляли насиченим водним розчином хлориду натрію (300 мл) і 1M HCl (500 мл), і двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні шари двічі промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію, двічі промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували *in vacuo*. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 5-30 % EtOAc/DCM. Фракції, що містили продукт, концентрували *in vacuo* для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді блідо-жовтої твердої речовини (9,03 г, 96 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 278,0/280,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Препаративна методика 45

4-бром-5-хлор-2-(гідроксиметил)-3-метилбензоат натрію



У флакон із гвинтовою кришкою з мішалкою додавали 5-бром-6-хлор-4-метил-3H-ізобензофуран-1-он (2,459 г, 8,557 ммоль) і 1M NaOH (9,4 мл, 9,4 ммоль). Флакон закривали кришкою, і нагрівали при 100 °C протягом 2 год. Реакційну суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, і переносили у 1 л колбу. Додавали толуол (100 мл), і суміш концентрували *in vacuo*, та поміщали у вакуум на 3 дні для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтувато-коричневої твердої речовини (2,81 г, 99+%). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 276,8/278,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

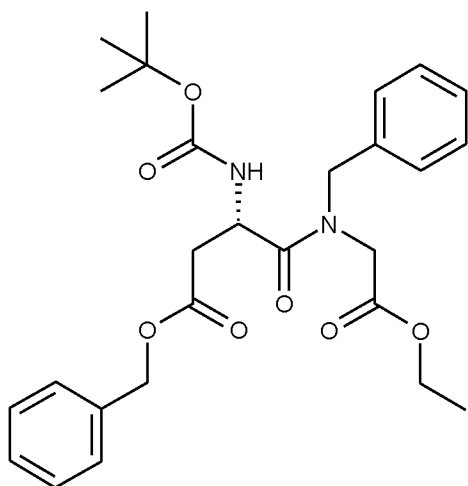
Таблиця 5

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічному методу Препаративної методики 45

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
46		3,5-дихлор-2-(гідроксиметил)-4-йодбензоат натрію	344,8/346,8

Препаративна методика 47

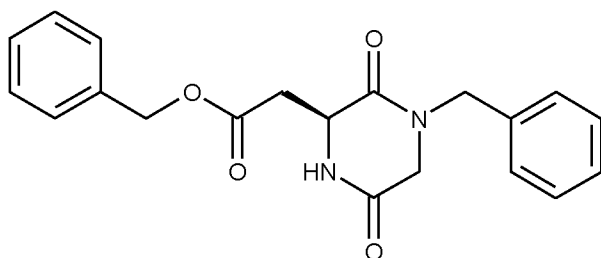
Бензил-(3S)-4-[бензил-(2-етокси-2-оксоетил)аміно]-3-(трет-бутоксикарбоніламіно)-4-оксобутаноат



У реакційну посудину додавали 4-бензиловий складний ефір Вос-L-аспарагінової кислоти (114 г, 352,6 ммоль). Додавали DCM (950 мл) та N,N'-дициклогексилкарбодіїмід (74,5 г, 361 ммоль), і суміш охолоджували до 10-20 °С. Краплями додавали етиловий складний ефір бензилгліцину (68,2 г, 353 ммоль), підтримуючи температуру нижче 20 °С. Суміш перемішували при 10-20 °С протягом 17 год., потім фільтрували, і концентрували in vacuo. Додавали МТВЕ (230 мл), і суміш перемішували протягом 0,5 год. Суміш фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді масла (174,4 г, 99 %).

Препаративна методика 48

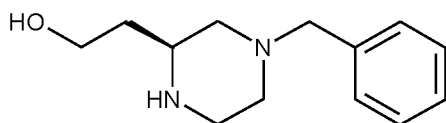
Бензил-2-[(2S)-4-бензил-3,6-діоксопіперазин-2-іл] ацетат



Бензил-(3S)-4-[бензил-(2-етокси-2-оксоетил)аміно]-3-(трет-бутоксикарбоніламіно)-4-оксобутаноат (174,4 г, 349,8 ммоль) додавали у реакційну посудину разом з DCM (500 мл) і TFA (230 мл). Суміш перемішували при 15-20 °С протягом 16 год., потім концентрували in vacuo насухо. Залишок розчиняли в ізопропанолі (500 мл), і нагрівали до 80 °С протягом 1 год. Суміш концентрували in vacuo, потім розбавляли водою (230 мл). Суміш нейтралізували 15 % NaOH у воді до pH 8-9 (використовують 109 г 15 % водного розчину NaOH). Суміш фільтрували, і промивали водою (2 × 100 мл). Тверді речовини сушили у вакуумі при 50-55 °С протягом 2 днів для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (95,9 г, 78 %). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,44-7,29 (m, 8H), 7,32-7,23 (m, 2H), 6,91 (br s, 1H), 5,18 (d, J=12,1 Гц, 1H), 5,14 (d, J=12,2 Гц, 1H), 4,64 (d, J=14,5 Гц, 1H), 4,54 (d, J=14,5 Гц, 1H), 4,44 (br d, J=7,9 Гц, 1H), 3,88 (d, J=17,7 Гц, 1H), 3,82 (d, J=17,7 Гц, 1H), 3,15 (dd, J=17,5 Гц, 3,4 Гц, 1H), 2,93 (dd, J=17,5 Гц, 8,3 Гц, 1H).

Препаративна методика 49

2-[(2S)-4-Бензилпіперазин-2-іл] етанол



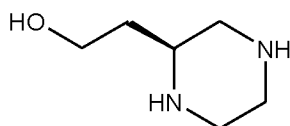
Алюмогідрид літію (13 г, 342,5 ммоль) додавали у реакційну посудину разом з THF (200 мл). Суміш охолоджували до -5-0 °С. У другу посудину додавали бензил-2-[(2S)-4-бензил-3,6-діоксопіперазин-2-іл]ацетат (50 г, 141,9 ммоль) разом з THF (400 мл). Розчин бензил-2-[(2S)-4-

бензил-3,6-діоксопіперазин-2-іл]ацетату повільно додавали до розчину алюмогідриду літію, підтримуючи температуру у межах від -5 °С до 0 °С. Реакційну суміш нагрівали до 60-65 °С, і перемішували протягом 2 год. Суміш охолоджували до 20-30 °С, і перемішували протягом 16 год. Додавали воду (13 г), потім додавали 4 % розчин NaOH у воді (52 г). Суміш перемішували протягом 1 год., фільтрували, і концентрували in vacuo. Додавали ізопропілацетат (200 мл) і 2M HCl (150 г). Шари розділяли, і водний шар знову промивали ізопропілацетатом (100 мл). Водний шар доводили до pH 11-12 з використанням NaOH, і додавали DCM (150 мл). Шари розділяли, і органічний шар промивали водою (100 мл). Шари розділяли, і органічний шар концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (20,1 г, 64 %).

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,44-7,20 (m, 5H), 3,81 (t, J=5,2 Гц, 2H), 3,50 (s, 2H), 3,08-2,93 (m, 2H), 2,93-2,82 (m, 1H), 2,76 (d, J=11,5 Гц, 2H), 2,02 (td, J=11,1, 3,3 Гц, 1H), 1,85 (t, J=10,4 Гц, 1H), 1,67-1,52 (m, 2H).

Препаративна методика 50

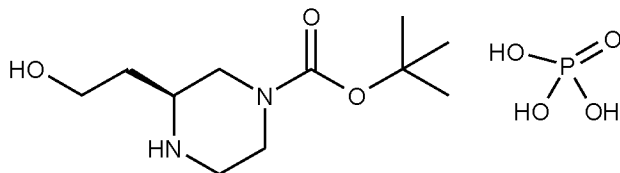
2-[(2S)-піперазин-2-іл]етанол



У промиту H₂ реакційну посудину додавали 2-[(2S)-4-бензилпіперазин-2-іл]етанол (20 г, 91 ммоль). Додавали MeOH (200 мл), і додавали Pd(OH)₂ (2 г). Суміш промивали H₂, потім піддавали дії тиску H₂ до 45 фунт/дюйм² (0,31 МПа). Суміш нагрівали до 50 °С, і перемішували протягом 44 год. Реакційну суміш фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді масла (12,7 г, 99+%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 3,84-3,65 (m, 2H), 3,44 (s, 1H), 2,99-2,83 (m, 4H), 2,78 (td, J=11,6 Гц, 2,5 Гц, 1H), 2,68 (td, J=11,4 Гц, 2,8 Гц, 1H), 2,54-2,42 (m, 1H), 1,65-1,43 (m, 2H).

Препаративна методика 51

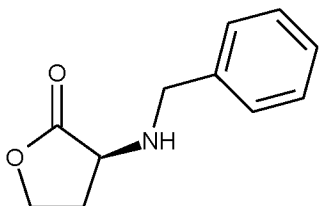
трет-Бутил-(3S)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат; фосфорна кислота



2-[(2S)-піперазин-2-іл]етанол (9,2 г, 70,4 ммоль) додавали у реакційну посудину разом з MeOH (83 мл) і водою (9 мл). Суміш перемішували протягом 0,5 год. при 15 °С. Ди-трет-бутилдикарбонат (15,4 г, 70,6 ммоль) додавали у другу посудину разом з MeOH (92 мл). Розчин ди-трет-бутилдикарбонату додавали до розчину 2-[(2S)-піперазин-2-іл]етанолу протягом 0,5 год., підтримуючи температуру нижче 15 °С. Суміш перемішували протягом 2 год. при 15 °С. Фосфорну кислоту (85 % міцність, 8,11 г, 70,4 ммоль) і EtOH об'єднували в окремій посудині, і розчин фосфорної кислоти додавали до реакційної суміші протягом 30 хв. Суміш перемішували протягом 20 хв при 15 °С, потім охолоджували до -5 °С протягом 3 год. Суміш перемішували при -5 °С протягом 1 год., фільтрували, і промивали EtOH, потім сушили при 50 °С протягом 4 год. для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (5,82 г, 25 %). ¹H ЯМР (D₂O) δ 4,11-4,03 (m, 1H), 4,00 (br s, 1H), 3,75-3,62 (m, 2H), 3,43-3,30 (m, 2H), 3,30-3,18 (m, 1H), 3,17-2,95 (m, 2H), 1,86-1,78 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

Препаративна методика 52

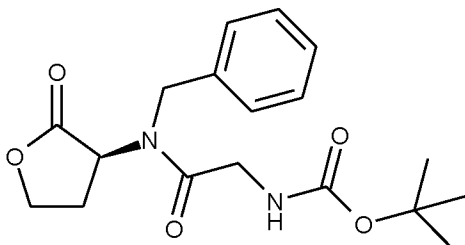
(3S)-3-(Бензиламіно)тетрагідрофуран-2-он



Суспензію гідрохлориду L-гомосерину лактону (100 г, 726,93 ммоль, 4А порошкоподібних молекулярних сит (178 г) і бензальдегіду (57 мл, 561,3 ммоль) в DCM (2500 мл)) перемішували протягом ночі в атмосфері азоту при 35 °С. Після збігання зазначеного часу нагрівання припиняли, і суміш охолоджували до 20 °С. Триацетоксиборогідрид натрію (208 г, 981,41 ммоль) додавали до суміші, яку потім витримували для нагрівання до температури навколишнього середовища через 20 хв, і перемішували протягом 2 год. Після збігання зазначеного часу суміш охолоджували до -10 °С, і обережно гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію (400 мл). рН доводили до 8 шляхом додавання насиченого водного розчину бікарбонату натрію та твердого бікарбонату натрію. Суміш фільтрували через шар діатомової землі, та промивали DCM. Шари розділяли, і водний шар додатково екстрагували DCM (1 л). Об'єднані органічні речовини сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді прозорого масла (87 г, 66,5 %, 81 % (мас.)). ES/MS m/z: 192,2 (M+H). Для подальшої аналітичної роботи зразок вказаної в заголовку сполуки (1 г) очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 10-50 % EtOAc/DCM, для одержання 422 мг очищеної вказаної в заголовку сполуки. Цей матеріал піддавали аналізу із застосуванням Chiralpak® IC, 4,6 × 150 мм, 10 % IPA (0,2 % EPAm)/CO₂, 5 мл/хв, 225 нм, який показав >98 % е.е.

Препаративна методика 53

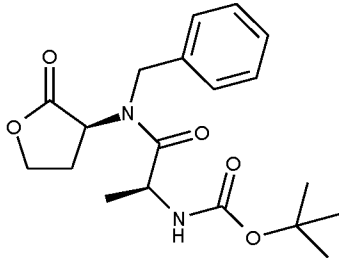
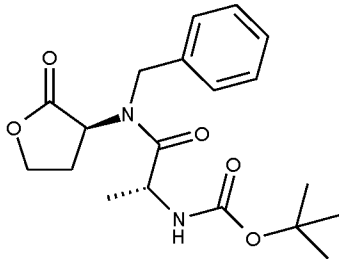
трет-Бутил-N-[2-[бензил-[(3S)-2-оксотетрагідрофуран-3-іл]аміно-2-оксоетил]карбамат



Суміш (3S)-3-(бензиламіно)тетрагідрофуран-2-ону (86 г, 364,27 ммоль, 81 % (мас.)), boc-Gly-OH (97 г, 553,71 ммоль) і TEA (103 мл, 739 ммоль) в DCM (700 мл) охолоджували до ~5 °С. До суміші протягом 1 год. краплями додавали пропілфосфоновий ангідрид (50 % (мас.) в EtOAc) (430 мл, 737 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру ~10 °С. Після додавання суміш витримували для нагрівання до температури навколишнього середовища. Через 7 год. суміш охолоджували до 10 °С, і додавали додаткову кількість boc-Gly-OH (3,1 г, 18 ммоль), TEA (5 мл, 35,9 ммоль) і пропілфосфонового ангідриду (50 % (мас.) в EtOAc) (22 мл, 37,7 ммоль). Суміш нагрівали до температури навколишнього середовища, і перемішували протягом ночі. Після збігання цього часу суміш охолоджували до 8 °С, і додавали додаткову кількість boc-Gly-OH (9,6 г, 55 ммоль), TEA (10 мл, 71,7 ммоль) і пропілфосфонового ангідриду (50 % (мас.) в EtOAc) (42 мл, 71,9 ммоль). Суміш нагрівали до температури навколишнього середовища, і перемішували протягом ~7 год. Після збігання цього часу суміш виливали на лід, і обережно гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію (1л). рН доводили до 8 твердим бікарбонатом натрію, і шари розділяли. Водний розчин ще двічі екстрагували DCM. Об'єднані органічні речовини промивали насиченим водним розчином хлориду натрію (500 мл). Органічний шар фільтрували через шар діатомової землі та сульфату натрію. Органічні речовини концентрували in vacuo до 1 л об'єму, і двічі промивали насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічні речовини сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки, яку слід використовувати без подальшого очищення (194 г, 53,5 %, 35 % (мас.)). ES/MS m/z: 249,0 (M-t-Bu+H)

Таблиця 6

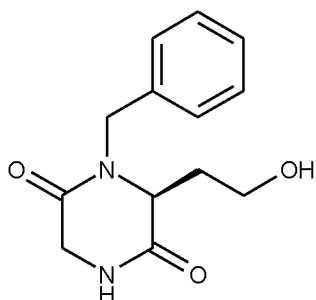
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 53

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
54		трет-бутил-N-[(1S)-2-[бензил-[(3S)-2-оксотетрагідрофуран-3-іл]аміно]-1-метил-2-оксоетил] карбамат	263,0
55		трет-бутил-N-[(1R)-2- [бензил-[(3S)-2-оксотетрагідрофуран-3-іл]аміно]-1-метил-2-оксоетил]карбамат	263,0

Препаративна методика 56

(6S)-1 -бензил-6-(2-гідрокіетил)піперазин-2,5-діон

5



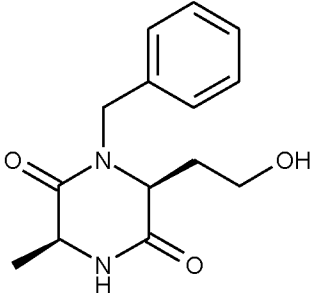
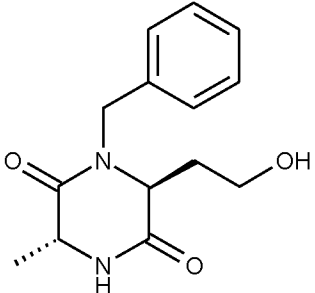
10 TFA (100мл, 1310 ммоль) додавали до суміші трет-бутил-N-[2-[бензил-[(3S)-2-оксотетрагідрофуран-3-іл]аміно]-2-оксоетил]карбамату (194 г, 194,9 ммоль, 35 % (мас.)) у DCM (500 мл). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Після збігання цього часу додавали додаткову кількість TFA (50 мл, 653 ммоль), і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища. Через 2 год. додавали додаткову кількість TFA (50 мл, 653 ммоль), і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Після збігання цього часу суміш концентрували in vacuo. Одержаний залишок розбавляли водою (600 мл), і двічі промивали діетиловим простим ефіром. pH доводили до 7 шляхом додавання 1 н. водного розчину NaOH, і додатково доводили до pH 12 шляхом додавання 5 н. водного розчину NaOH. Додавали MeOH (~10 мл), і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища. До суміші з інтервалом у 5 хв додавали додаткову кількість 5 н. водного розчину NaOH для доведення pH до 12. Загалом суміш перемішували при pH 12 протягом 35 хв. Після збігання цього часу pH доводили до 8 за допомогою 10 % водного розчину HCl, і екстрагували DCM (5 × 1 л). Потім pH водного розчину доводили до 5 шляхом додавання 10 % водного розчину HCl, і знову екстрагували DCM (1 л). Об'єднані органічні речовини сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді світло-коричневої твердої речовини (17 г, 33,4 %).

25 Додаткові екстракції водного розчину проводять по чергово 25 % IPA/хлороформу та DCM доти, доки за даними LC/MS вказаний в заголовку продукт не буде видалений з водного розчину. До об'єднаних органічних речовин додавали IPA (150 мл). Органічні шари двічі промивали

насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію та сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання додаткової кількості вказаної в заголовку сполуки (17,2 г, 35,5 %) із загальним виходом 34,2 г (68,9 %). ES/MS m/z: 249,0 (M+H).

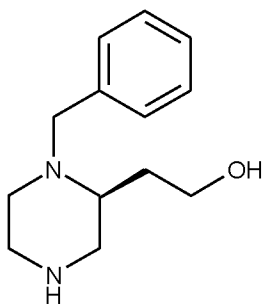
Таблиця 7

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 56

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
57		(3S, 6S)-1-бензил-6-(2-гідроксіетил)-3-метилпіперазин-2,5-діон	263,0
58		(3R,6S)-1-бензил-6-(2-гідроксіетил)-3-метилпіперазин-2,5-діон	263,0

5

Препаративна методика 59
2-[(2S)-1-Бензилпіперазин-2-іл] етанол



10

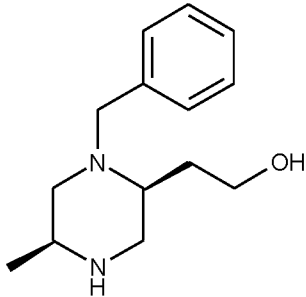
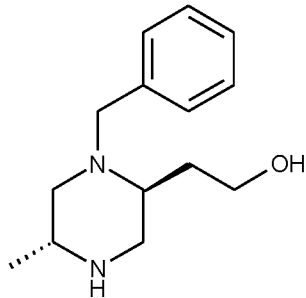
До 2М розчину алюмогідриду літію в THF (131 мл, 262 ммоль) при 45 °С краплями додавали розчин (68)-1-бензил-6-(2-гідроксіетил)піперазин-2,5-діону (34 г, 131,5 ммоль) у THF (200 мл). Після завершення додавання суміш нагрівали до 60 °С. Через -3,5 год. додавали додаткову кількість 2М розчину алюмогідриду літію в THF (33 мл, 66 ммоль), і суміш перемішували при 60 °С. Через 1 год. додавали додаткову кількість 2М розчину алюмогідриду літію в THF (131 мл, 262 ммоль), і суміш перемішували при 60 °С протягом ночі. Після збігання цього часу додавали 2М розчин алюмогідриду літію у THF (6 мл, 12 ммоль), і суміш перемішували при 60 °С. Через 4 год. додавали 2М розчин алюмогідриду літію у THF (6мл, 12 ммоль), і суміш перемішували протягом 2 год. при 60 °С. Нагрівання припиняли, і суміш охолоджували до 10 °С. Краплями додавали воду (16 мл), потім краплями додавали 3,75М водного розчину NaOH (16 мл), потім THF (300 мл). Додавали воду (48 мл), і одержану суміш перемішували протягом ночі при температурі навколишнього середовища. Після збігання цього часу суміш фільтрували через шар діатомової землі, і промивали EtOAc. Фільтрат концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки (28,8 г, 67,6 %, 68 % (мас.)). ES/MS m/z: 221,0 (M+H).

15

20

Таблиця 8

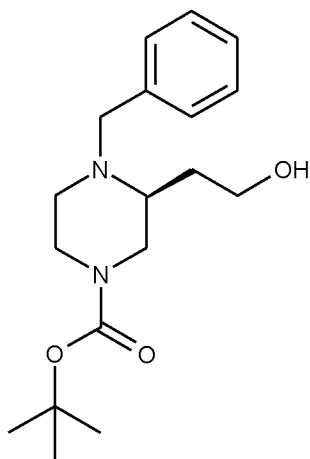
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 59

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
60		2-[(2S,5S)-1-бензил-5-метилпіперазин-2-іл] етанол	235,0
61		2-[(2S,5R)-1-бензил-5-метилпіперазин-2-іл]етанол	235,0

Препаративна методика 62

трет-Бутил (3S)-4-бензил-3-(2-гідроксietил)піперазин-1-карбоксилат

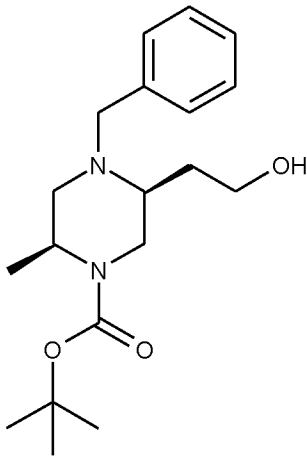
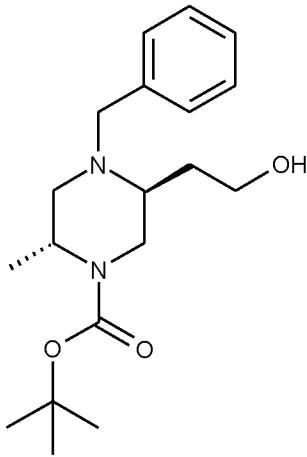
5



Бікарбонат натрію (80 г, 952 ммоль) у воді (500 мл) додавали до 2-[(2S)-1-бензилпіперазин-2-іл]етанолу (28 г, 86,43 ммоль) у 1,4-діоксані (500 мл) при температурі навколишнього середовища. Додавали ди-трет-бутилдикарбонат (26,6 г, 122 ммоль), і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 20 хв. Після збігання цього часу додавали лід (400 мл), воду (200 мл) та EtOAc (1 л), і розділяли шари. Водний розчин ще раз екстрагували EtOAc (1л). Об'єднані органічні речовини промивали водою (250 мл) і насиченим водним розчином хлориду натрію (250 мл), сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержане масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 10-70 % EtOAc/гексани, для одержання вказаної в заголовку сполуки (20,79 г, 74 %). ES/MS m/z: 321,2 (M+H). Цей матеріал піддавали аналізу із застосуванням Chiralpak® IC, 4,6 × 150 мм, 15 % EPA (0,2 % IPAm)/CO₂, 5 мл/хв, 225 нм, який показав 96 % e.e.

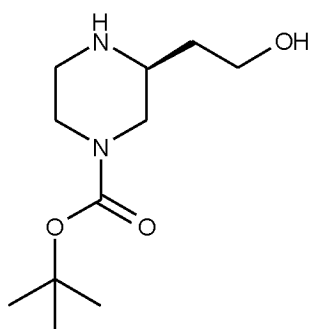
Таблиця 9

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 62

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
63		трет-бутил-(2S, 5S)-4-бензил-5-(2-гідроксіетил)-2-метилпіперазин-1-карбоксилат	335,0
64		трет-бутил-(2R, 5S)-4-бензил-5-(2-гідроксіетил)-2-метилпіперазин-1-карбоксилат	335,0

Препаративна методика 65

трет-Бутил-(3S)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат



5

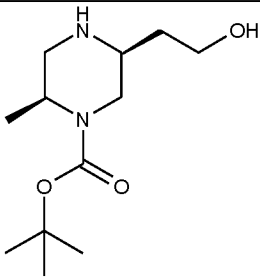
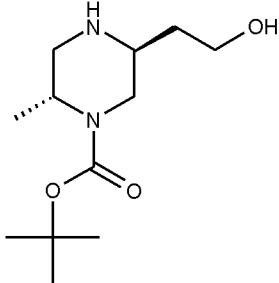
10

20 % Pd(OH)₂ на вуглеці (24,39 г, 176,4 ммоль) додавали у посудину, яку продували азотом. У посудину додавали спочатку EtOH (620 мл), потім трет-бутил-(3S)-4-бензил-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат (61,93 г, 193,3 ммоль) і EtOH (620 мл). Посудину герметизували, продували азотом, продували воднем, і створювали підвищений тиск водню (60 фунт/дюйм² (0,42 МПа)). Посудину поміщали на шейкер Парра на 15 год. при температурі навколишнього середовища. Після збігання цього часу реакційну суміш фільтрували, і

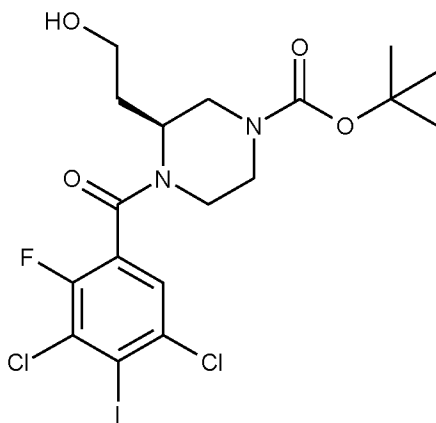
концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки (42,74 г, 98 %). ES/MS m/z 231,0: (M+H).

Таблиця 10

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 65

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
66		трет-бутил-(2S,5S)-5-(2-гідроксіетил)-2-метилпіперазин-1-карбоксилат	245,0
67		трет-бутил-(2R,5S)-5-(2-гідроксіетил)-2-метилпіперазин-1-карбоксилат	245,0

- 5 Препаративна методика 68
трет-Бутил-(3S)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-йодбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат



10

- До DIEA (2 мл, 11,5 ммоль) у THF (22 мл) додавали спочатку 3,5-дихлор-2-фтор-4-йодбензойну кислоту (0,80 г, 2,4 ммоль), потім HATU (0,84 г, 2,2 ммоль), і перемішували протягом 1 год. Потім додавали трет-бутил-(3S)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат (0,50 г, 2,2 ммоль), і реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі. Після збігання цього часу додавали 5 н. NaOH, і реакційну суміш перемішували протягом 1 год. Додавали EtOAc і воду. Водний шар двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищену суміш очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи сумішшю EtOAc: гексану (30:70), для одержання вказаної в заголовку сполуки (0,858 г, 72 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 491/493 [M-t-Bu+H]⁺.

20

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 68

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
69		трет-бутил-(3S)-4-(4-бром-5-хлор-2,3-дифторбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат	427,0/429,0
70		трет-бутил-(3S)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат	408,8/410,8
71		трет-бутил-(3S)-4-(4-бром-3-хлор-2-фторбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат	408,9/411,0
72		трет-бутил-(3R)-4-(5-хлор-2-фтор-4-йод-5-метил-бензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	457,0/459,2

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 68

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
73		трет-бутил-(3R)-4-(5-хлор-2,3-дифтор-4-йодбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	461,0/463,0
74		трет-бутил-(3R)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-йодбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	476,8/478,8
75		трет-бутил-(3R)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	394,8/396,8
76		трет-бутил-(3R)-4-(4-бром-3-хлор-2-фторбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	394,8/396,8

Таблиця 11

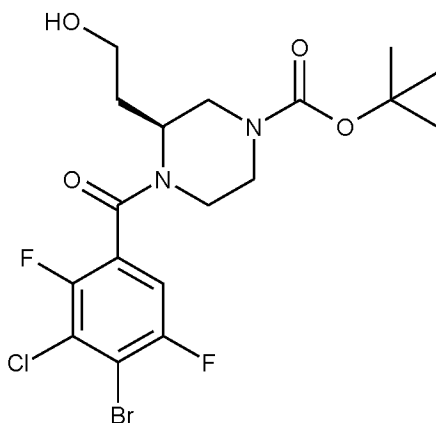
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 68

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
77		трет-бутил-(3R)-4-(3-хлор-2,5-дифтор-4-йодбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	461,0/463,0
78		трет-бутил-(3S)-4-(3-хлор-2,5-дифтор-4-йодбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	461,2/463,0
79		трет-бутил-(3S)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-йодбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	477,0/478,9
80		трет-бутил-(3R)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-йодбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат	490,9/492,8

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 68

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
81		трет-бутил-(3S)-4-(5-хлор-2,3-дифтор-4-йодбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	461,0/463,0
82		трет-бутил-(3S)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	394,8/396,8
83		трет-бутил-(3R)-4-(4-бром-5-хлор-2-фторбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат	408,8/410,8
84		трет-бутил-(3S)-4-(2-аміно-4-бром-5-хлорбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат	406,0/408,0

Препаративна методика 85
трет-Бутил-(3S)-4-(4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат



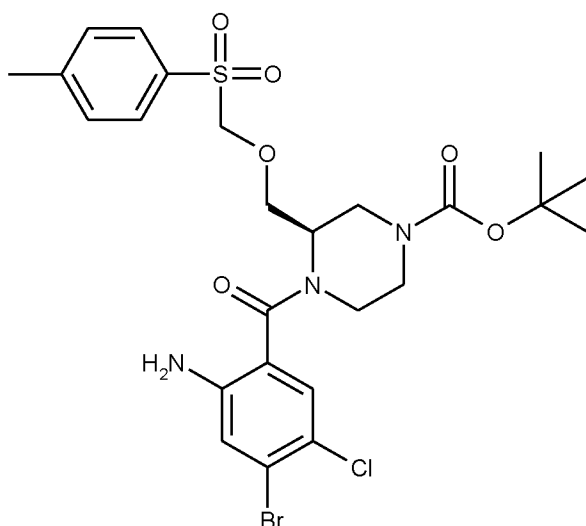
Розчин 4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензойної кислоти (10,2 г, 37,6 ммоль) і 4-метилморфоліну (7,50 мл, 68,0 ммоль) у THF (200 мл) охолоджували до 0 °С на льодяній бані, і обробляли 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазином (9,10 г, 50,8 ммоль). Суміш перемішували на льодяній бані протягом 30 хв, після чого через краплинну лійку краплями додавали трет-бутил-(3S)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат (0,93М в THF, 40,0 мл, 37,2 ммоль). Через 1 год. при 0 °С додавали 5 н. NaOH (35,0 мл, 180 ммоль), і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 30 хв. Суміш розбавляли EtOAc, обробляли насиченим розчином бікарбонату натрію, і перемішували протягом 15 хв. Органічну фазу відокремлювали, промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи сумішшю 0-90 % (20 % ацетон у OCM)/гексан), для одержання вказаної в заголовку сполуки (16,0 г, 88 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 427/429 [M-t-Bu+H]⁺.

Таблица 12

Сполука, синтезована методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 85

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
86		трет-бутил-(3R)-4-(4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоїл)-3-(гідроксиметил)піперазин-1-карбоксилат	412,8/414,8

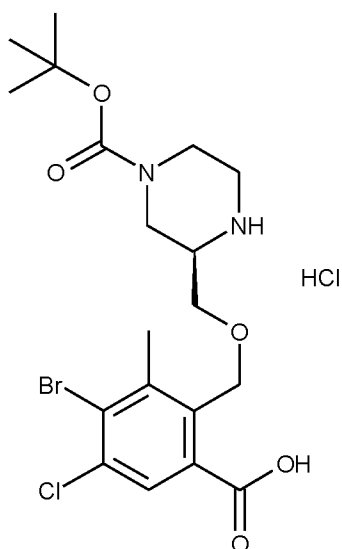
Препаративна методика 87
трет-Бутил-(3S)-4-(2-аміно-4-бром-5-хлорбензоїл)-3-[2-(p-толілсульфонілокси)етил]піперазин-1-карбоксилат



До розчину трет-бутил-(3S)-4-(2-аміно-4-бром-5-хлорбензоїл)-3-(2-гідроксietил)піперазин-1-карбоксилату (1 г, 2,16 ммоль) і TEA (1 мл, 7,14 ммоль) в DCM (25 мл) при 0 °C додавали DMAP (45 мг, 0,36 ммоль) і р-толуолсульфонілхлорид (469 мг, 2,39 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 0 °C протягом 15 хв перед витриманням для нагрівання до температури навколишнього середовища. Через 3 год. додавали додаткову кількість р-толуолсульфонілхлориду (122 мг, 0,62 ммоль). Через 1 год. реакційну суміш розбавляли DCM, і промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію. Органічні речовини промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі для одержання вказаної в заголовку сполуки (473 мг, 35 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 616,0/618,0 [M+H]⁺.

Препаративна методика 88

Гідрохлорид 4-бром-2-[[[(2R)-4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-2-іл]метоксиметил]-5-хлор-3-метилбензойної кислоти

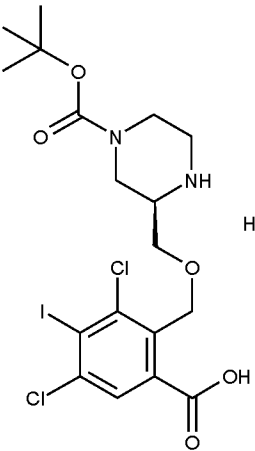
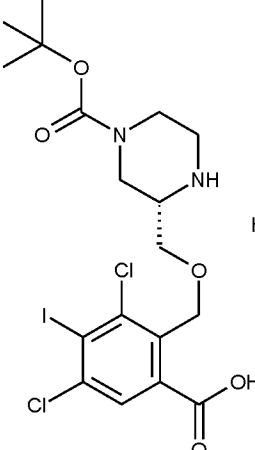


До 4-бром-5-хлор-2-(гідроксиметил)-3-метилбензоату натрію (2,05 г, 6,39 ммоль) у 250 мл колбі додавали толуол (50 мл), і суміш концентрували in vacuo. Залишок розчиняли у DMF (21 мл) і THF (11 мл), і охолоджували до 0 °C. Додавали гідрид натрію (60 % (мас.) у парафіновому маслі) (511 мг, 12,8 ммоль). Після завершення додавання суміш перемішували при 0 °C протягом 10 хв. До трет-бутил-(3aR)-1,1-діоксо-3a,4,6,7-тетрагідро-3H-оксатіазоло[3,4-a]піразин-5-карбоксилату (1,96 г, 7,04 ммоль) у другій колбі додавали толуол (20 мл), і суміш концентрували in vacuo. Залишок розчиняли у THF (11 мл), і додавали краплями до вмісту першої колби при 0 °C. Суміш нагрівали до температури навколишнього середовища, і перемішували протягом 1,5 год. Повільно додавали 5M HCl (7 мл), і суміш перемішували при

температурі навколишнього середовища протягом 5 хв, після чого гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію. Повільним додаванням 5М HCl рН знижували до рН 2, і суміш розбавляли EtOAc. Шари розділяли, і водний шар тричі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок розчиняли у THF (40 мл), і додавали 5М HCl (6 мл). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 20 хв. Суміш розбавляли насиченим водним розчином хлориду натрію та EtOAc, і шари розділяли. Органічний шар сушили над сульфатом натрію, фільтрували, концентрували in vacuo, і поміщали у вакуум на 2 год. для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді жовтувато-коричневої твердої речовини (4,27 г, 73 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 477,2/479,2 [M+H]⁺.

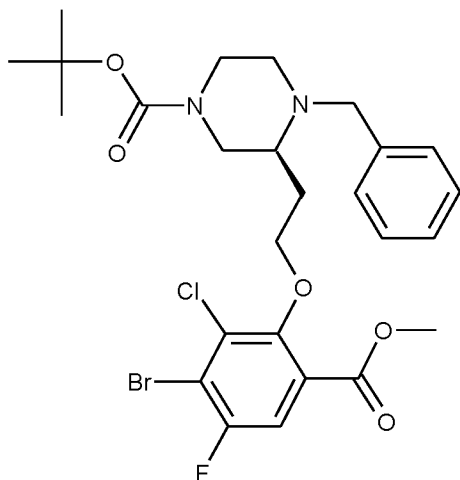
Таблиця 13

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 88

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
89		гідрохлорид 2-[[[(2R)-4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-2-іл]метоксиметил]-3,5-дихлор-4-йодбензойної кислоти	545,2/547,2
90		гідрохлорид 2-[[[(2S)-4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-2-іл]метоксиметил]-3,5-дихлор-4-йодбензойної кислоти	545,0/547,2

Препаративна методика 91

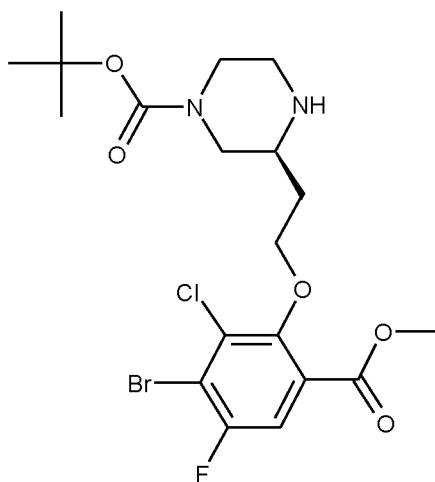
трет-Бутил-(3S)-4-бензил-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонілфенокси)етил]піперазин-1-карбоксилат



Розчин метил-4-бром-3-хлор-5-фтор-2-гідроксибензоату (3,0 г, 11,0ммоль), трифенілфосфіну (4,19 г, 16,0ммоль) і трет-бутил-(3S)-4-бензил-3-(2-гідроксietил)піперазин-1-карбоксилату (12 мл, 1,039M в THF) у THF (~50 мл) охолоджували до 0 °С протягом 10 хв. Краплями додавали діізопропілазодикарбоксилат (3,1 мл, 16 ммоль), і суміш витримували для нагрівання до температури навколишнього середовища. Після вичерпання спиртового вихідного матеріалу додавали лід, і реакційну суміш розбавляли EtOAc. Суміш двічі промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, і органічний шар сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo до масла бурштинового кольору. Залишок очищали хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи 0-10 % EtOAc/гексанів, для одержання вказаної в заголовку сполуки (6,2 г, 99+%). Аналітичний зразок ~95 % чистоти одержували із застосуванням хроматографії на колонках із силікагелем, елюючи сумішшю 25-50 % (1:1 EtOAc:OCM)/гексанів, для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді безбарвного масла. ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 585/587 [M+H]⁺.

Препаративна методика 92

трет-Бутил-(3S)-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонілфенокси)етил]піперазин-1-карбоксилат



20

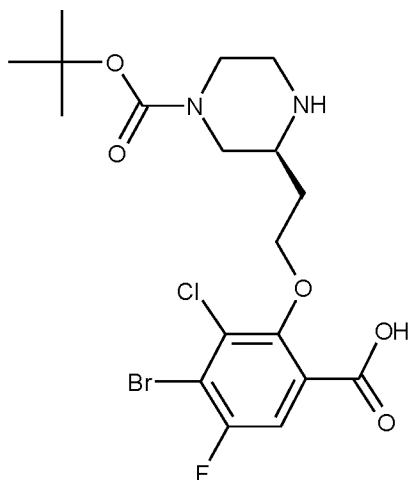
До розчину трет-бутил-(3S)-4-бензил-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонілфенокси)етил]піперазин-1-карбоксилату (7,0 г, 11,35ммоль) у DCM (75 мл) додавали N,N-діізопропіламін (5,94 мл, 34,1 ммоль). Розчин охолоджували на льодяній бані, і краплями додавали 1-хлоретилхлорформіат (3,7 мл, 34 ммоль). Після завершення додавання льодяну баню видаляли, і реакційну суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 18 год. Додаткову кількість 1-хлоретилхлорформіату (2 мл, 17 ммоль) і N,N-діізопропіламіну (3 мл, 17 ммоль) додавали краплями при температурі навколишнього середовища, і через 7 год. додавали додаткову кількість 1-хлоретилхлорформіату (0,60 мл, 5,67 ммоль) і N,N-діізопропіламін (1 мл, 5,67 ммоль) для вичерпання залишку початкового матеріалу.

30

Реакційну суміш концентрували in vacuo. До залишку додавали толуол, і суміш концентрували (повторювали 2х). Одержану напівтверду речовину розбавляли MeOH (100 мл), і перемішували при температурі навколишнього середовища до завершення утворення продукту. Розчинник видаляли in vacuo для одержання залишку бурштинового кольору. Залишок очищали хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи 0-10 % MeOH/DCM, для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (5,11 г, 91 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 495/497 [M+H]⁺.

Препаративна методика 93

4-Бром-2-[2-[(2S)-4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-2-іл]етокси]-3-хлор-5-фторбензойна кислота

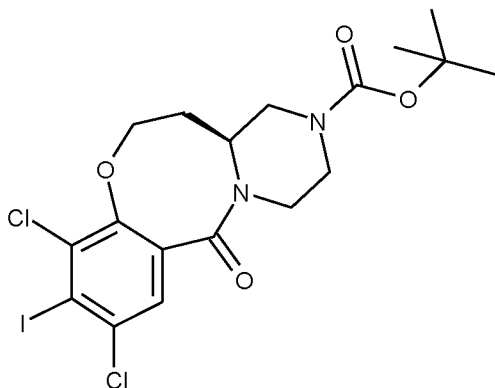


Розчин

трет-бутил-(3S)-3-[2-(3-бром-2-хлор-4-фтор-6-метоксикарбонілфенокси)етил]піперазин-1-карбоксилату (5 г, 10,08 ммоль) у THF (100 мл) і MeOH (12 мл) охолоджували на льодяній бані. Додавали водний розчин гідроксиду літію (6,5 мл, 6,25М) і деіонізовану воду (10 мл). Льодяну баню видаляли, і суміш перемішували при температурі навколишнього середовища. Через 3 год. до реакційної суміші додавали лід, і регулювали pH 5-6 шляхом додавання 10 % лимонної кислоти (12 мл). Додавали насичений водний розчин хлориду натрію (100 мл), суміш розбавляли EtOAc (400 мл), і шари розділяли. Водний шар знову екстрагували EtOAc (300 мл), і об'єднані органічні речовини сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (4,83 г, 98 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 481/483 [M+H]⁺.

Препаративна методика 94

трет-Бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-йодо-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат

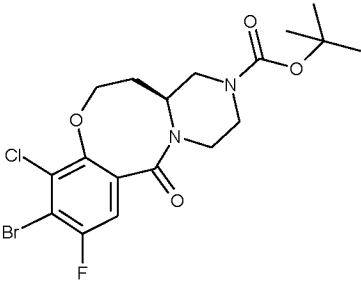
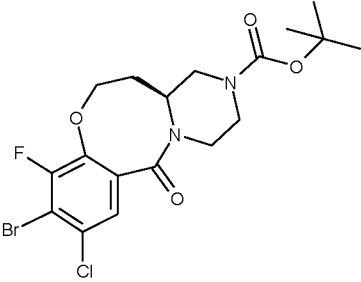
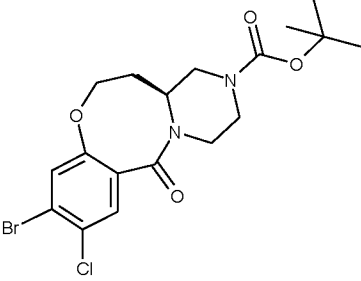
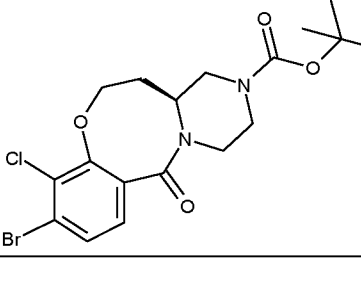


трет-Бутил-(3S)-4-(3,5-дихлор-2-фтор-4-йодбензоїл)-3-(2-гідроксіетил)піперазин-1-карбоксилат (4,438 г, 8,110 ммоль) у DMF (100 мл) охолоджували до 0 °C, після чого до розчину додавали твердий гідрід натрію (60 % (мас.) у парафіновому маслі) (0,81 г, 20 ммоль). Через 1 год. при 0 °C реакційну суміш гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію.

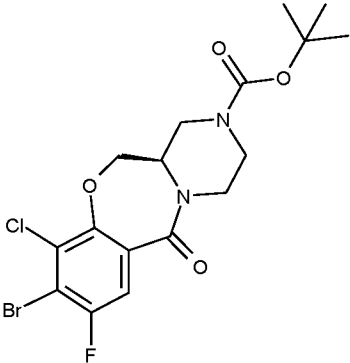
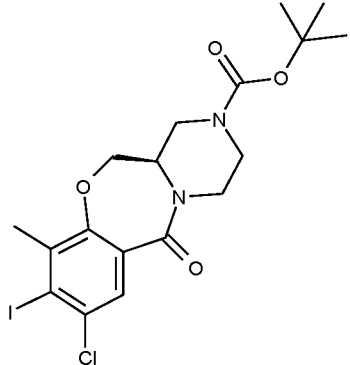
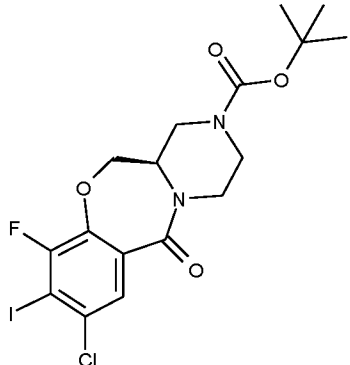
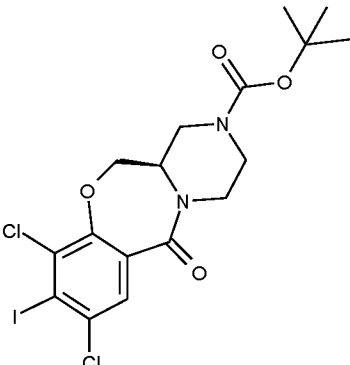
Додавали воду та EtOAc. Водний шар двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти двічі промивали. 0,2М водним розчином хлориду літію, сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищену суміш очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 30-50 % EtOAc/гексанів, для одержання вказаної в заголовку сполуки (3,394 г, 79 %). ES/MS m/z ($^{35}\text{C}^{37}\text{C}1$) 471/473 [M-t-Bu+H] $^{+}$.

Таблиця 14

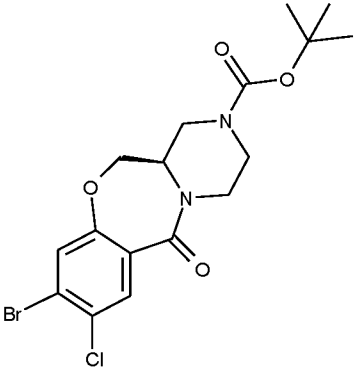
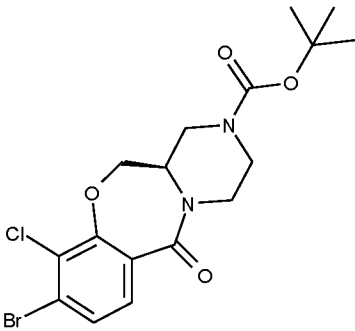
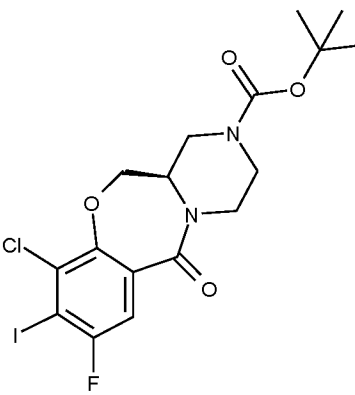
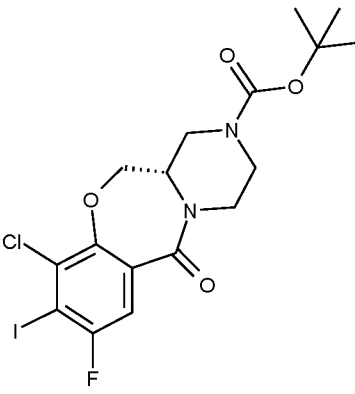
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 94

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
95		трет-бутил-(13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	407,0/409,0
96		трет-бутил-(13aS)-9-бром-8-хлор-10-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	406,9/409,0
97		трет-бутил- (13aS)-9-бром-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	388,8/390,8
98		трет-бутил-(13aS)-9-бром-10-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	389,0/391,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 94

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
99		трет-бутил-(4aR)-8-бром-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	393,0/395,0
100		трет-бутил-(4aR)-7-хлор-8-йодо-7-метил-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	9437,0
101		трет-бутил-(4aR)-9-хлор-7-фтор-8-йодо-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	441,0/443,0
102		трет-бутил-(4aR)-7,9-дихлор-8-йодо-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	456,8/458,8

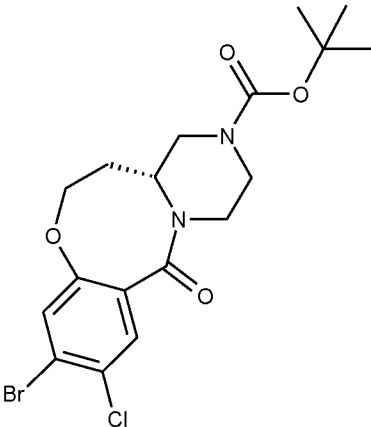
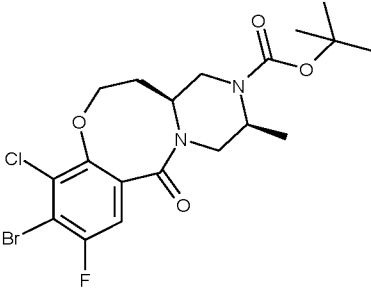
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 94

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
103		трет-бутил-(4aR)-8-бром-9-хлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	374,8/376,8
104		трет-бутил-(4aR)-8-бром-7-хлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	374,8/376,8
105		трет-бутил-(4aR)-7-хлор-9-фтор-8-йодо-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	441,0/443,0
106		трет-бутил-(4aS)-7-хлор-9-фтор-8-йодо-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	441,0/443,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 94

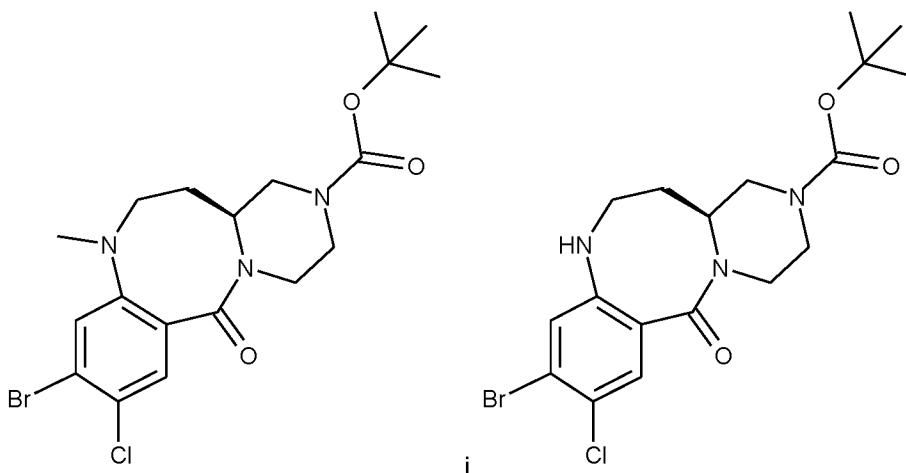
Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
107		трет-бутил-(4aS)-7,9-дихлор-8-йодо-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	456,9/458,9
108		трет-бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-йодо-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	470,8/472,8
109		трет-бутил-(4aS)-9-хлор-7-фтор-8-йодо-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	441,0/443,0
110		трет-бутил-(4aS)-8-бром-9-хлор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	374,8/376,8

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 94

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
111		трет-бутил-(13aR)-9-бром-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	388,8/390,8
112		трет-бутил-(3S,13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	421,0/423,0

Препаративна методика 113

трет-Бутил-(13aS)-9-бром-8-хлор-11-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-2-карбоксилат і трет-бутил-(13aS)-9-бром-8-хлор-6-оксо-3,4,11,12,13,13а-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-2-карбоксилат

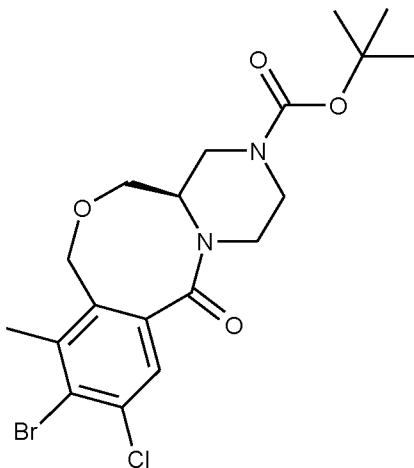


трет-Бутил-(3S)-4-(2-аміно-4-бром-5-хлорбензоїл)-3-[2-(p-толілсульфонілокси)етил]піперазин-1-карбоксилат (473 мг, 0,767 ммоль) в DMF (15 мл) охолоджували до 0 °C, після чого до розчину додавали твердий гідрід натрію (60 % (мас.) у парафіновому маслі) (49 мг, 1,225 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 0 °C протягом 2 год., після чого витримували для нагрівання до температури навколишнього середовища, і додатково перемішували протягом 2 год. Після збігання цього часу реакційну суміш охолоджували до -78 °C, і додавали метилйодид (50 мкл, 0,803 ммоль). Через 30 хв реакційну

суміш нагрівали до 0 °С, перемішували протягом 18 год., і нагрівали до температури навколишнього середовища. Суміш знову охолоджували до 0 °С, і додавали додаткову кількість йодистого метилу (50 мкл, 0,803 ммоль). Через 1 год. додаткового метилювання не спостерігалось, реакційну суміш нагрівали до температури навколишнього середовища, і додавали триетиламін (100 мкл, 0,717 ммоль). Ще через 1 год. реакційну суміш гасили водою, і розбавляли насиченим водним розчином NH₄Cl та EtOAc. Шари розділяли, і водний шар ще двічі екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні речовини промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом натрію, і концентрували in vacuo. Одержану тверду речовину розтирали з ACN, і сушили in vacuo без будь-якого подальшого очищення для одержання суміші згаданих у заголовку сполук (3:2 NH до NMe, 345 мг, 99+%). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 444,0/446,0 [M+H]⁺ та 458,0/460,0 [M+H]⁺.

Препаративна методика 114

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



Розчин гідрохлориду 4-бром-2-[(2R)-4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-2-іл]метоксиметил]-5-хлор-3-метилбензойної кислоти (500 мг, 0,749 ммоль) і DIEA (0,39 мл, 2,2 ммоль) у DMF (3,7 мл) краплями додавали до розчину HATU (581 мг, 1,50 ммоль) у DMF (3,7 мл) при 0 °С. Суміш перемішували при 0 °С протягом 1 год. і протягом 30 хв при температурі навколишнього середовища. В окремій колбі розчин гідрохлориду 4-бром-2-[(2R)-4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-2-іл]метоксиметил]-5-хлор-3-метилбензойної кислоти (2,62 г, 3,92 ммоль, 77 % чистота) і DIEA (2,1 мл, 12 ммоль) у DMF (20 мл) краплями додавали до розчину HATU (3,04 г, 7,84 ммоль) у DMF (20 мл) при 0 °С. Суміш перемішували при 0 °С протягом 1 год. і протягом 30 хв при температурі навколишнього середовища. Дві реакційні суміші об'єднували, розбавляли EtOAc, і промивали 0,5M HCl, водою, насиченим водним розчином бікарбонату натрію та насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічний шар сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 0-65 % EtOAc/гексанів. Чисті фракції концентрували in vacuo. До залишку додавали DCM, суміш концентрували in vacuo, і поміщали у вакуум на 3 год. для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (1,95 г, 86 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 459/461 [M+H]⁺.

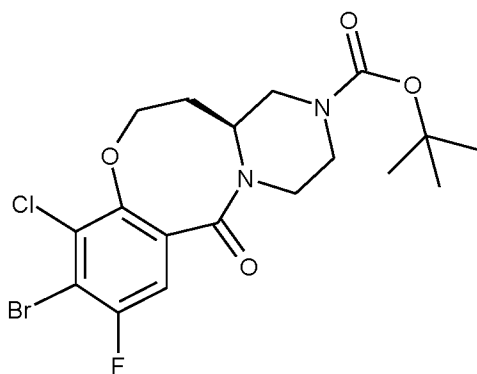
Таблиця 15

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 114

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
115		трет-бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-йодо-6-оксо-1,3,4,11,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	527,2/529,0
116		трет-бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-йодо-6-оксо-1,3,4,11,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	471,0/473,0

Препаративна методика 117

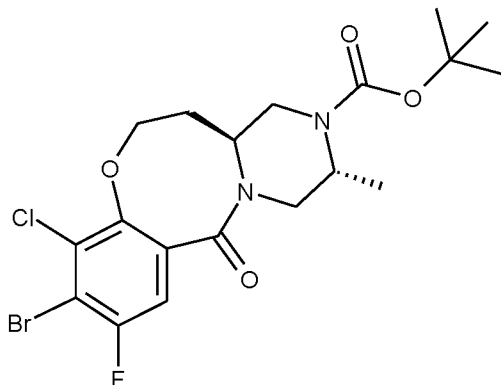
5 трет-Бутил-(13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино [2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат



10 До розчину 4-бром-2-[2-[(2S)-4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-2-іл]етокси]-3-хлор-5-фторбензойної кислоти (4,8 г, 10 ммоль) у DCM (50 мл), охолодженого на льодяній бані, додавали TEA (2,8 мл, 20 ммоль). Краплями додавали пропілфосфоновий ангідрид (11 мл, 18,8 ммоль, 50 % (мас.) в EtOAc). Після додавання суміш перемішували протягом 10 хв. Додавали DCM (250 мл) і насичений розчин хлориду амонію (100 мл). Водний шар видаляли, і екстрагували DCM (100 мл), а об'єднані органічні шари промивали насиченим водним розчином

15 хлориду натрію (100 мл), сушили над сульфатом натрію, і фільтрували. Фільтрат обробляли активованим вугіллям (3,5 г), і перемішували протягом 10 хв. Суміш фільтрували через шар діатомової землі, і концентрували in vacuo до масла. Додавали хлороформ, і концентрували in vacuo (повторювали 2х) для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (4,64 г, 99 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 407/409 [M-t-Bu+H]⁺.

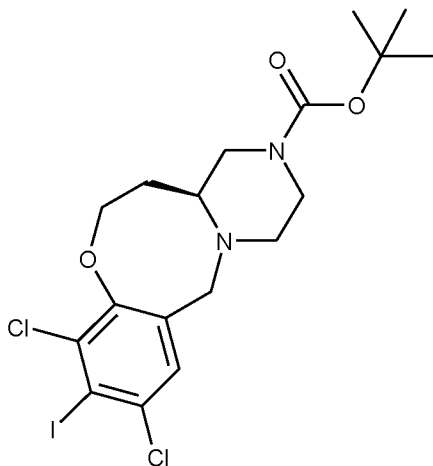
Препаративна методика 118
 трет-Бутил-(3R,13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат



5

Розчин метил-4-бром-3-хлор-2,5-дифторбензоату (1,00 г, 3,50 ммоль) і трет-бутил-(2R,5S)-5-(2-гідроксіетил)-2-метилпіперазин-1-карбоксилату (1,07 г, 4,38 ммоль) у DMF (17,5 мл) охолоджували на льодяній бані. Додавали карбонат цезію (2,31 г, 7,01 ммоль). Реакційну суміш витримували для нагрівання до температури навколишнього середовища протягом ночі. Через 18 год. реакційну суміш нагрівали до 80 °C протягом 24 год. Після охолодження до кімнатної температури додавали напівнасичений водний розчин хлориду натрію (50 мл), суміш розбавляли EtOAc (100 мл), і шари розділяли. Водний шар екстрагували ще два рази EtOAc (50 мл), об'єднані органічні речовини промивали водою (2 × 50 мл), насиченим водним розчином хлориду натрію (50 мл), після чого сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 0-100 % MTBE/гексану, для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (690 мг, 41 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 476,0/478,0 [M+H]⁺.

Препаративна методика 119
 трет-Бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-йодо-3,4,6,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат



1M комплексу борандиметилсульфіду в THF (2 мл, 2 ммоль) додавали до перемішуваної суміші трет-бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-йодо-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилату (1,0 г, 1,9 ммоль) у THF (20 мл), і нагрівали зі зворотним холодильником протягом 18 год. Після збігання цього часу до суміші додавали додаткову кількість 1M комплексу борандиметилсульфіду в THF (2 мл, 2 ммоль), і додатково перемішували для нагрівання зі зворотним холодильником протягом 5 год. Суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, обережно гасили MeOH, і концентрували in vacuo. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем,

елюючи 30-70 % EtOAc/гексану, для одержання вказаної в заголовку сполуки (900 мг, 90 %).
ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 512,8/514,8 [M+H]⁺,

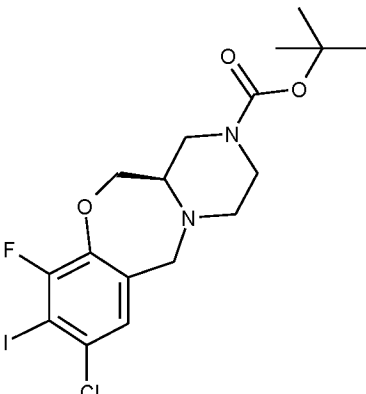
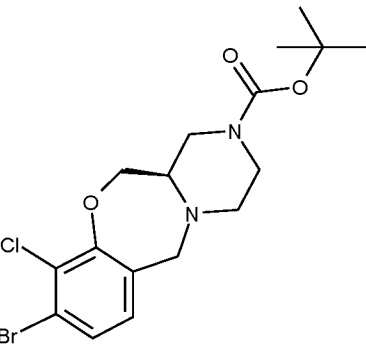
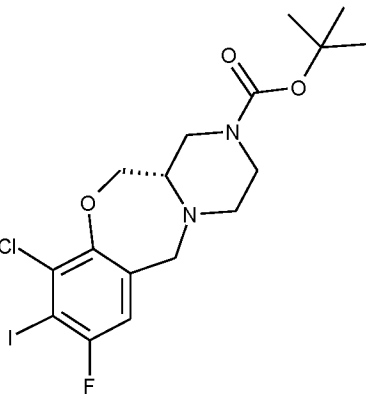
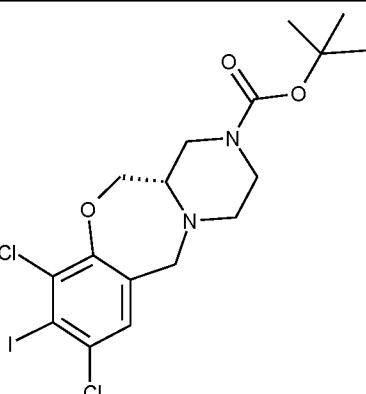
Таблиця 16

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 119

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
120		трет-бутил-(13aS)-9-бром-8-хлор-3,4,6,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	430,9/433,0
121		трет-бутил-(4aR)-1,9-дихлор-8-йодо-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-c][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	498,8/500,8
122		трет-бутил-(4aR)-7-хлор-9-фтор-8-йодо-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-c][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	483,2/485,2

Таблиця 16

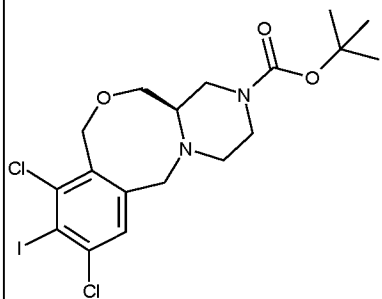
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 119

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
123		трет-бутил-(4aR)-9-хлор-7-фтор-8-йодо-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	483,0/485,0
124		трет-бутил-(4aR)-8-бром-7-хлор-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	417,0/419,0
125		трет-бутил-(4aS)-7-хлор-9-фтор-8-йодо-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	483,2/485,2
126		трет-бутил-(4aS)-7,9-дихлор-8-йодо-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	499,0/501,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 119

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
127		трет-бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-йодо-3,4,6,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	512,9/514,8
128		трет-бутил-(4aS)-9-хлор-7-фтор-8-йодо-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	483,0/485,0
129		трет-бутил-(4aS)-8-бром-9-хлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	416,8/419,0
130		трет-бутил-(13aR)-9-бром-8-хлор-10-метил-3,4,6,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	445,2/447,2

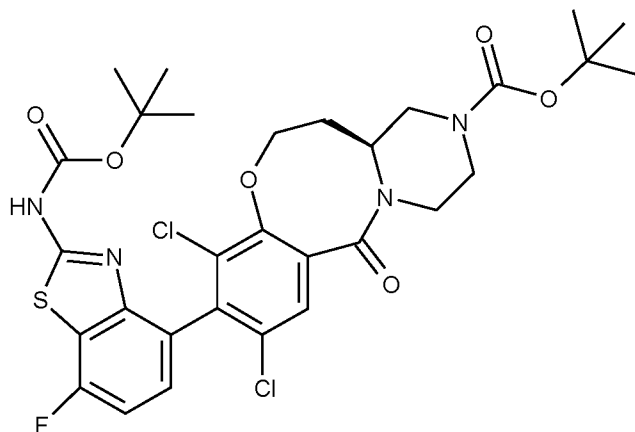
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 119

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
131		трет-бутил-(13aR)-8,10-дихлор-9-йодо-3,4,6,11,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	513,2/515,2

Препаративна методика 132

трет-Бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8,10-дихлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат

5



У герметичну пробірку з гвинтовою кришкою з мішалкою додавали трет-бутил-(13aS)-8,10-дихлор-9-йодо-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат (750 мг, 1,423 ммоль), [2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]борну кислоту (650 мг, 2,083 ммоль), ортофосфат калію (450 мг, 2,12 ммоль) і дихлорид 1,1'-біс(ди-трет-бутилфосфіно)фероценпаладію (100 мг, 0,15 ммоль). Додавали попередньо змішані та знегажені 1,4-діоксан (15 мл) та воду (5 мл), і суміш продували азотом протягом 20 хв. Пробірку закривали кришкою, і нагрівали при 80 °C протягом 1 год. Потім вміст реакційної суміші виливали у воду, насичений водний розчин хлориду натрію та EtOAc. Шари розділяли, а водний шар один раз екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти сушили над безводним сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 30-70 % EtOAc/гексану, для одержання вказаної в заголовку сполуки (724 мг, 76 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 667/669 [M+H]⁺. Співвідношення атропізомерів 45:55 (LC).

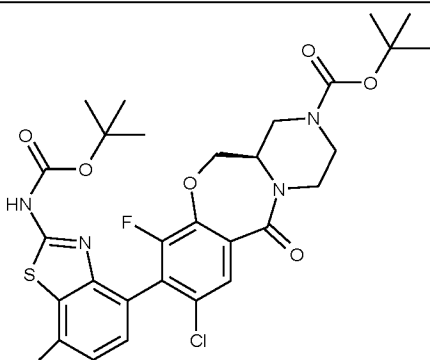
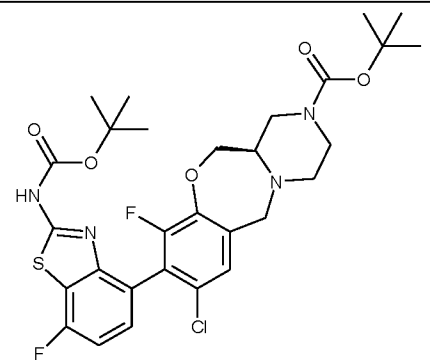
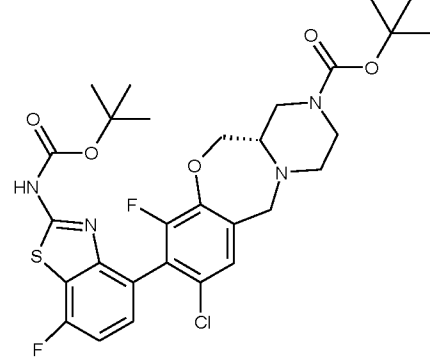
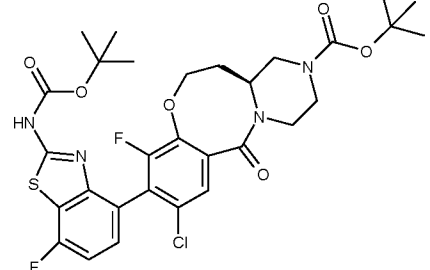
10

15

20

Таблиця 17

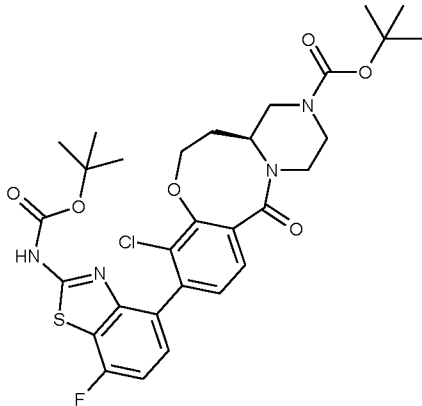
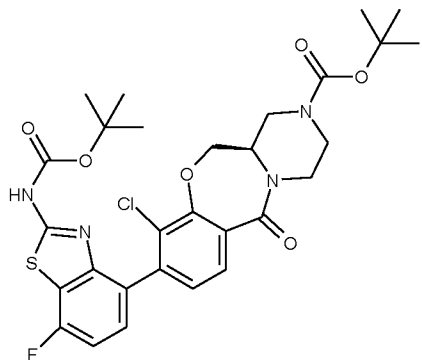
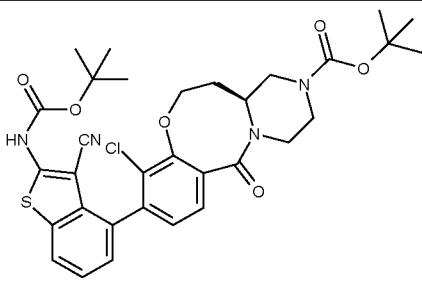
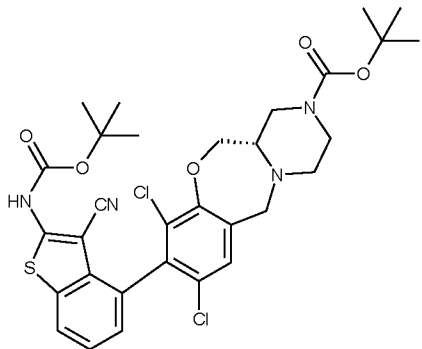
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
133		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-9-хлор-7-фтор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	537,2/539,2
134		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	623,2/625,2
135		трет-бутил-(4aS)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	623,2/625,2
136		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8-хлор-10-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	551,1/553,1

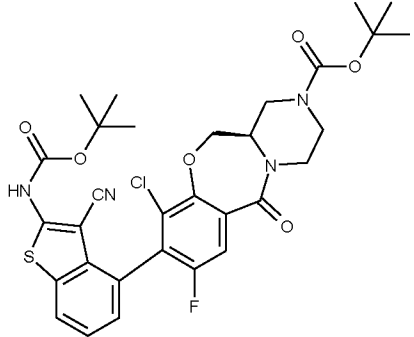
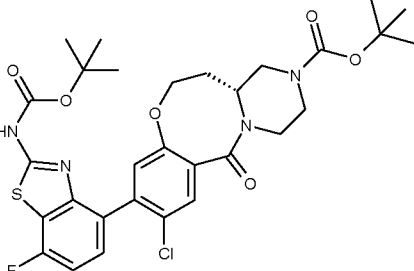
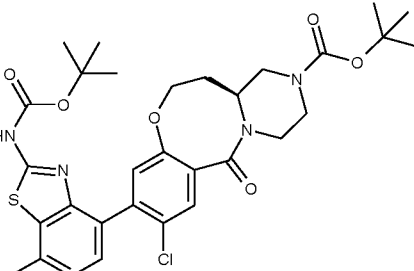
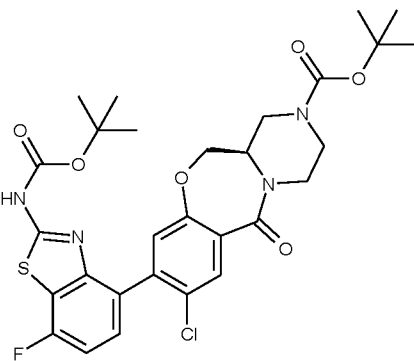
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
137		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	537,2/539,2
138		трет-бутил-(4aS)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-7-хлор-9-фтор-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	623,4/625,4
139		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-9-хлор-7-метил-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	533,2/534,2
140		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	551,0/553,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
141		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-10-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	533,0/535,0
142		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-7-хлор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-c][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	519,0/521,0
143		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціанобензотіофен-4-іл]-10-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	539,0/541,0
144		трет-бутил-(4aS)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціанобензотіофен-4-іл]-7,9-дихлор-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-c][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	645,4/647,4

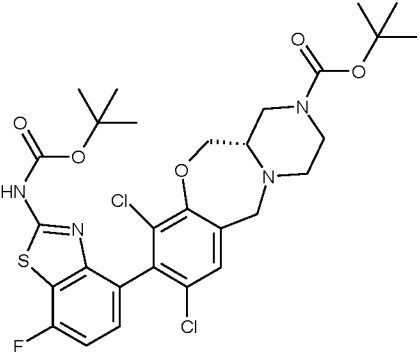
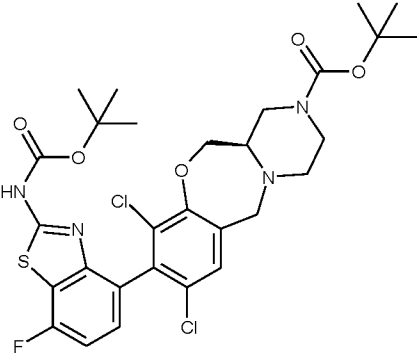
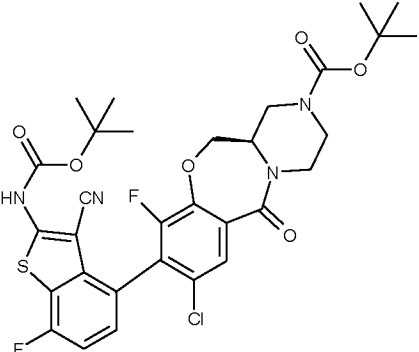
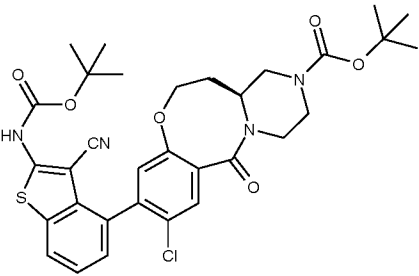
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
145		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціанобензотіофен-4-іл]-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	587,2/589,2
146		трет-бутил-(13aR)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	533,0/535,0
147		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	533,0/535,0
148		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-9-хлор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	519,0/521,0

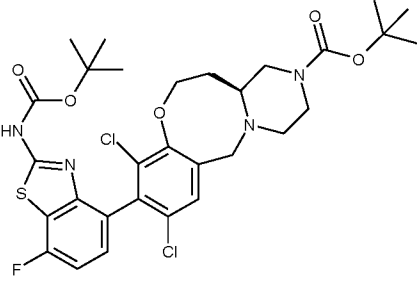
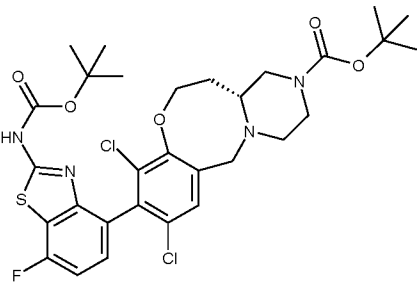
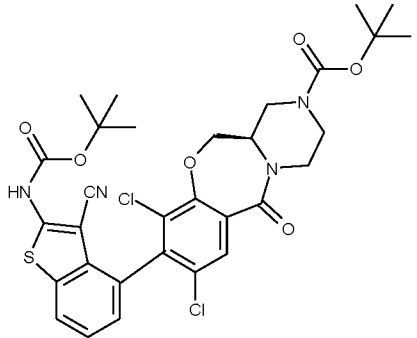
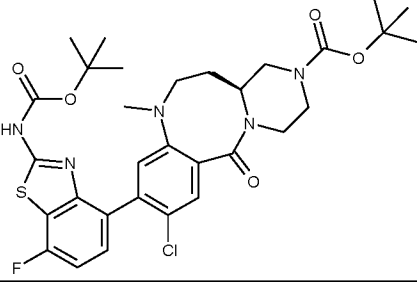
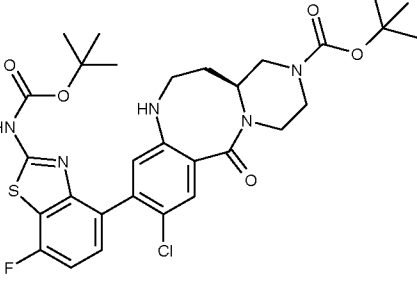
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
149		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-7,9-дихлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	553,0/555,0
150		трет-бутил-(4aS)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-7,9-дихлор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	553,0/555,0
151		трет-бутил-(4aS)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-9-хлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	605,0/607,0
152		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-9-хлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	605,0/607,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
153		трет-бутил-(4aS)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-7,9-дихлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	639,0/641,0
154		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-7,9-дихлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	639,0/641,0
155		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціано-7-фторбензотіофен-4-іл]-9-хлор-7-фтор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	605,0/607,0
156		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціанобензотіофен-4-іл]-8-хлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	639,2/641,2

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
157		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	653,0/655,2
158		трет-бутил-(13aR)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	653,0/655,0
159		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціанобензотіофен-4-іл]-7,9-дихлор-11-оксо-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-c][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	603,0/605,0
160		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8-хлор-11-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-2-карбоксилат	646,2/648,2
161		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8-хлор-6-оксо-3,4,11,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-2-карбоксилат	632,2/634,2

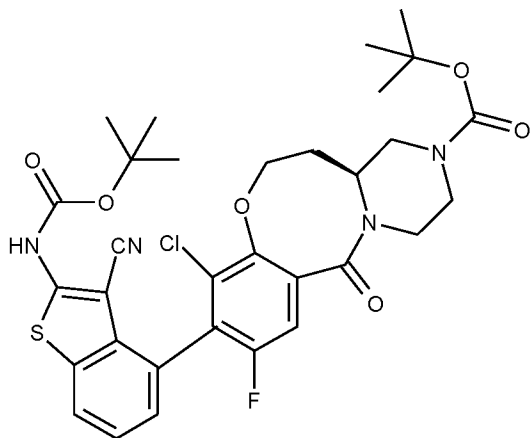
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 132

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
162		трет-бутил-(13aR)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8-хлор-10-метил-6-оксо-1,3,4,11,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	645,2/647,2
163		трет-бутил-(13aR)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8-хлор-10-метил-3,4,6,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	633,4/635,4
164		трет-бутил-(13aR)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8,10-дихлор-6-оксо-1,3,4,11,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	665,2/667,2
165		трет-бутил-(13aR)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8,10-дихлор-3,4,6,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	653,4/655,2
166		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8,10-дихлор-3,4,6,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	665,2/667,2

У деяких випадках замість K_3PO_4 використовували K_2CO_3 .

Препаративна методика 167

5 трет-Бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціанобензотіофен-4-іл]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат



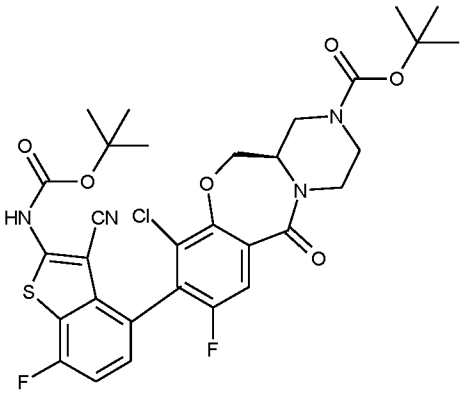
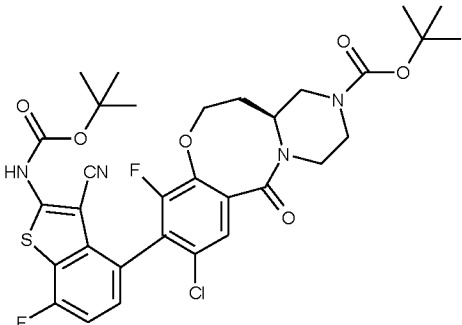
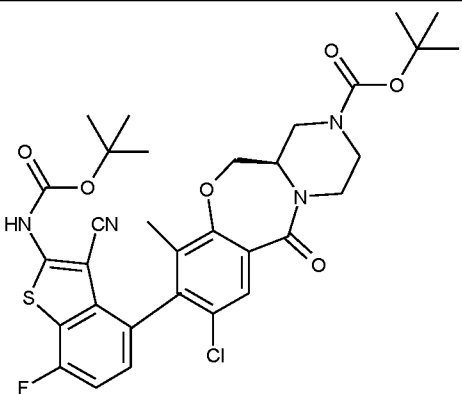
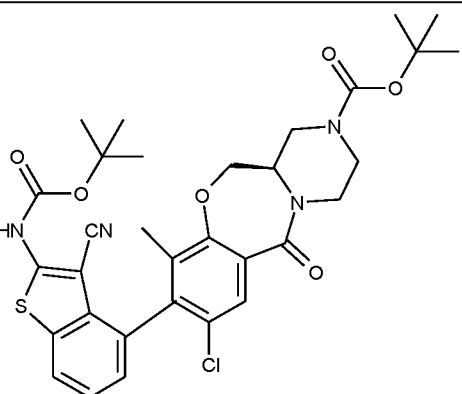
У герметизовану колбу додавали толуол (300 мл). трет-бутил-(13aS)-9-бром-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат (6,20 г, 11,0 ммоль) і трет-бутил-N-[3-ціано-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)бензотіофен-2-іл]карбамат (6,20 г, 15,5 ммоль). Суміш барботували азотом протягом 30 хв, після чого додавали спочатку DPEPhosPdCl₂ (1,20 г, 1,68 ммоль), після чого карбонат цезію (9,00 г, 27,6 ммоль). Колбу герметизували, і перемішували при 105 °C протягом 6 год. Суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, і фільтрували через діатомову землю, промивали EtOAc, і фільтрат концентрували in vacuo. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи 0-30 % ацетону/гексану. Потрібний діастереомер елювали після небажаного, одержуючи вказану в заголовку сполуку (основна, 3,50 г, 49 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 657,0/659,0 [M+H]⁺.

Таблица 18

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 167

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
168		трет-бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціано-7-фторбензотіофен-4-іл]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5] бензоксазоцин-2-карбоксилат	675,2/677,2

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 167

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
169		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціано-7-фторбензотіофен-4-іл]-7-хлор-9-фтор-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	605,2/607,2
170		трет-бутил-(13aS)-9-[2(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціано-7-фторбензотіофен-4-іл]-8-хлор-10-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5] бензоксазоцин-2-карбоксилат	675,2/677,2
171		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-3-метилбензотіофен-4-іл]-9-хлор-7-метил-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	601,2/603,3
172		трет-бутил-(4aR)-8-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-метилбензотіофен-4-іл]-9-хлор-7-метил-11-оксо-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-карбоксилат	583,2/585,2

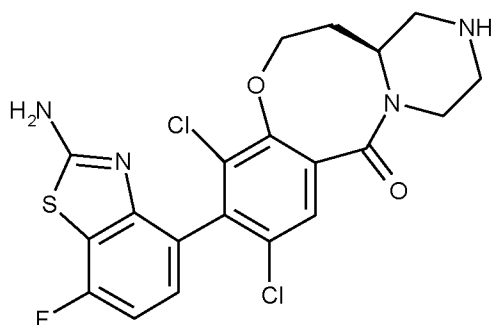
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 167

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
173		трет-бутил-(3R,13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціано-7-фторбензотіофен-4-іл]-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	689,2/691,2
174		трет-бутил-(3S,13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціано-7-фторбензотіофен-4-іл]-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат	633,4/635,4

Препаративна методика 175

(13aS)-9-(2-Аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1d][1,5]бензоксазоцин-6-он

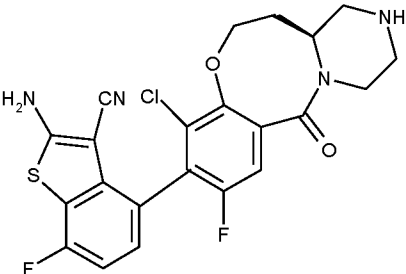
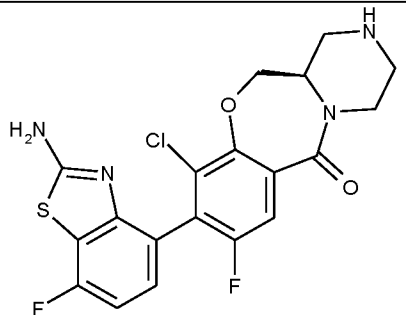
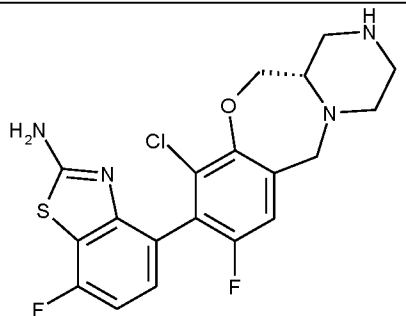
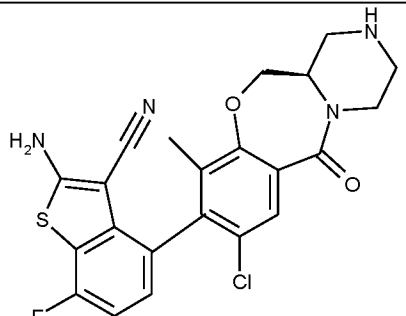
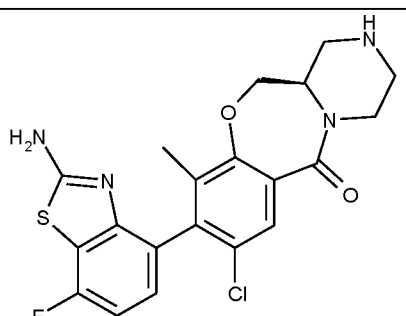
5



трет-Бутил-(13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл]-8,10-дихлор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилат (724 мг, 1,084 ммоль) розчиняли у DCM (4 мл) та TFA (2 мл, 26,45 ммоль), і перемішували при температурі навколишнього середовища. Через 6 год. суміш концентрували in vacuo. Неочищений продукт завантажували на колонку SCX, промивали MeOH та елюювали 7 н. NH₃ в MeOH. Фільтрат концентрували in vacuo для одержання вказаної в заголовку сполуки (500 мг, 98 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 467/469 [M+H]⁺.

15

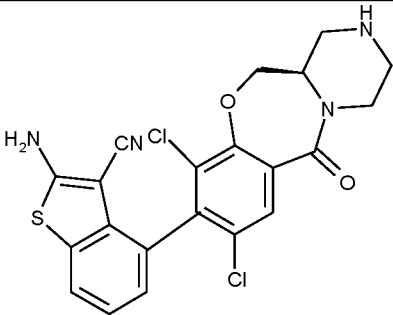
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 175

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
176		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13, 13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	475,0/477,0
177		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7-хлор-9-фтор-1,2,3,4,4a,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	437,2/439,2
178		4-[(4aS)-7-хлор-9-фтор-2,3,4,4a,5,11-гексагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	423,2/425,2
179		4-[(4aR)-9-хлор-7-метил-11-оксо-1,2,3,4,4a,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	457,2/459,2
180		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-7-метил-1,2,3,4,4a,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	433,2/435,2

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 175

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
181		(4aR)-8-(2-аміно-3-метилбензотіофен-4-іл)-9-хлор-7-метил-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	439,1/441,2
182		4-[(4aS)-7,9-дихлор-2,3,4,4а,5,11-гексагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	445,0/447,0
183		4-[(4aR)-7-хлор-9-фтор-11-оксо-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	443,2/445,2
184		4-[(13aS)-8,10-дихлор-1,2,3,4,6,12,13,13а-октагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	453,0/455,0
185		4-[(13aR)-8,10-дихлор-1,2,3,4,6,12,13,13а-октагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	453,0/455,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 175

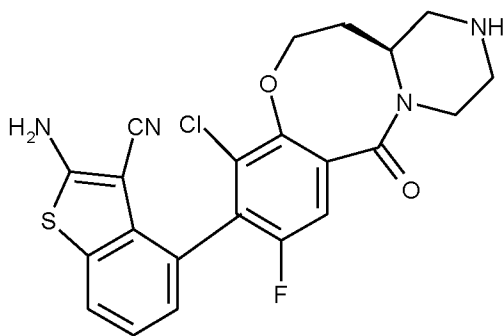
Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
186		4-[(4aR)-7,9-дихлор-11-оксо-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	458,9/460,9

Препаративна методика 187

4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил

[1,5]

5



До суспензії трет-бутил- (13aS)-9-[2-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-ціанобензотіофен-4-іл]-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-2-карбоксилату (2,64 г, 4,02 ммоль) у DCM (10,0 мл) при 0 °С краплями додавали TFA (10 мл). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 1 год. Суміш концентрували in vacuo, розчиняли в EtOAc, і знову концентрували in vacuo. Цю процедуру повторювали ще один раз. Одержаний залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи спочатку 0-80 % (10 % MeOH в DCM)/DCM, після чого - 0-100 % [10 % (7 н. NH₃ в MeOH) в DCM]/DCM, для одержання вказаної в заголовку сполуки (1,58 г, 86 %). ES/MS m/z (⁵Cl/⁷Cl) 457,0/459,0 [M+H]⁺.

10

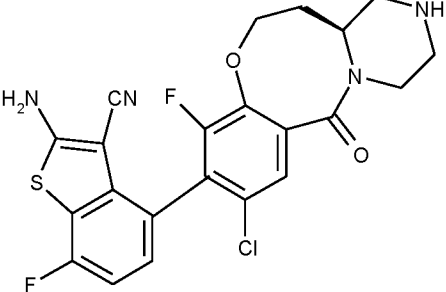
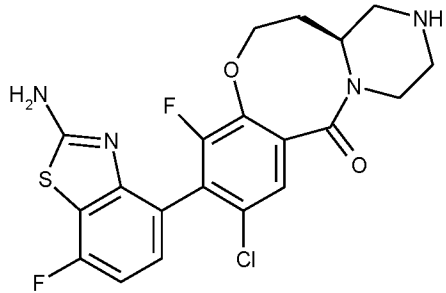
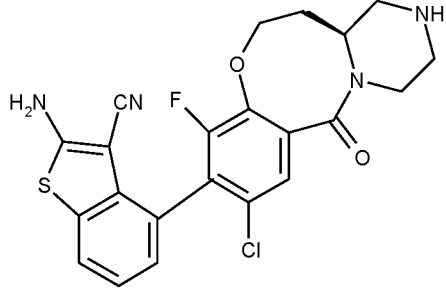
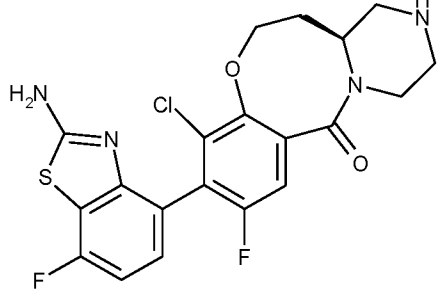
15

Таблиця 20

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
188		4-[(4aR)-9-хлор-7-фтор-11-оксо-1,2,3,4,4a,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	461,0/463,0
189		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-7-фтор-1,2,3,4,4a,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	437,0/439,0
190		4-[(4aR)-9-хлор-7-фтор-2,3,4,4a,5,11-гексагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	423,0/425,0
191		4-[(4aS)-9-хлор-7-фтор-2,3,4,4a,5,11-гексагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	423,0/425,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
192		4-[(13aS)-8-хлор-10-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	475,0/477,0
193		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-10-фтор-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	451,0/453,0
194		4-[(13aS)-8-хлор-10-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	457,0/459,0
195		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-10-хлор-8-фтор-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	451,0/453,0

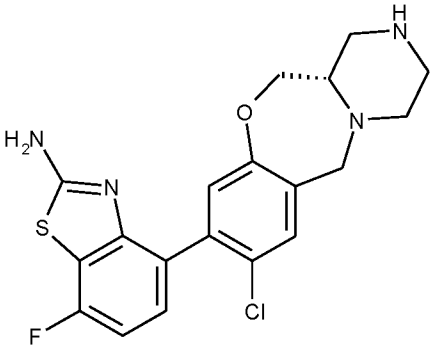
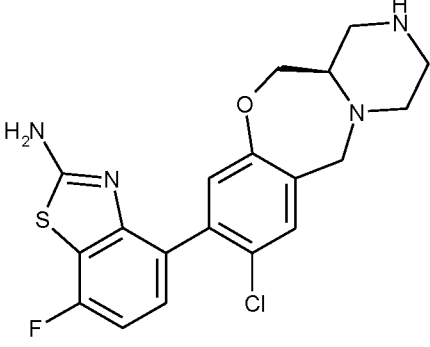
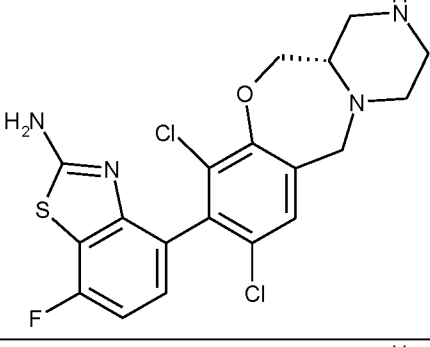
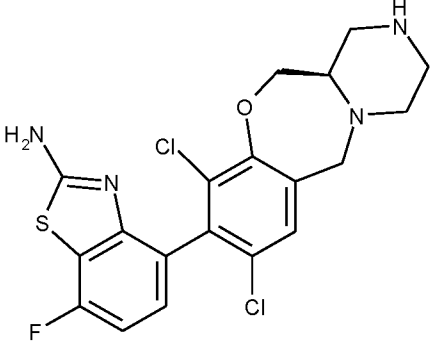
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
196		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-10-хлор-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1- <i>d</i>][1,5]бензоксазоцин-6-он	433,0/435,0
197		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7-хлор-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1- <i>c</i>][1,4]бензоксазепін-11-он	419,0/421,0
198		4-[13aS]-10-хлор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1- <i>d</i>][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	439,0/441,0
199		(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1- <i>d</i>][1,5]бензоксазоцин-6-он	433,0/435,0

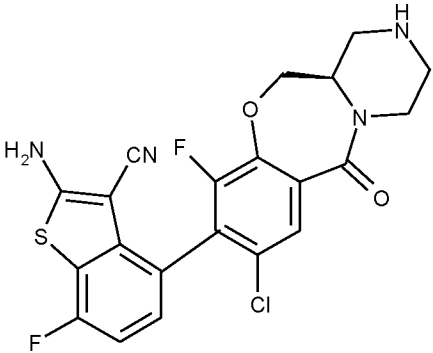
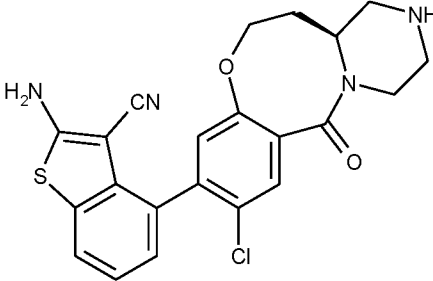
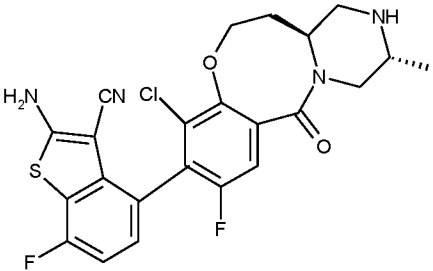
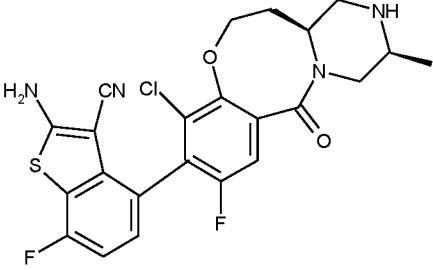
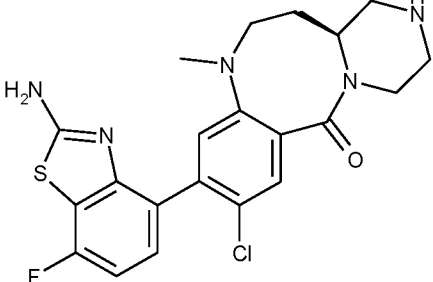
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
200		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	432,9/435,0
201		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	418,9/420,9
202		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7,9-дихлор-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	452,8/454,8
203		(4aS)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7,9-дихлор-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	452,8/454,8

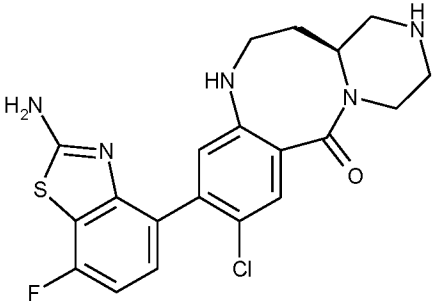
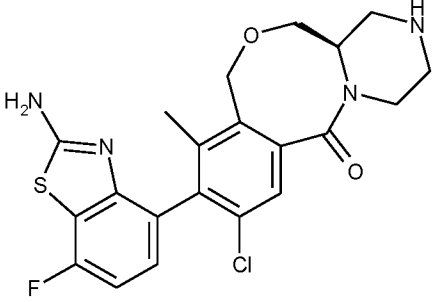
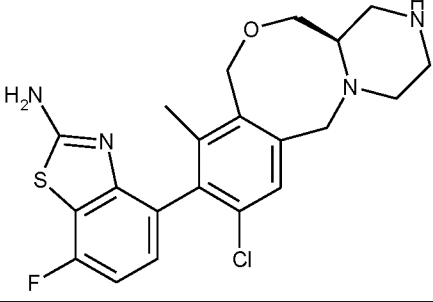
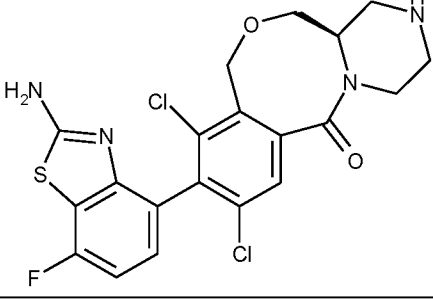
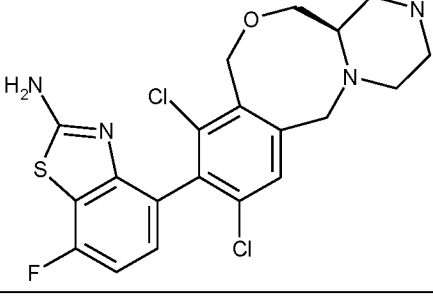
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
204		4-[(4S)-9-хлор-2,3,4,4а,5,11-гексагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	405,0/407,0
205		4-[(4aR)-9-хлор-2,3,4,4а,5,11-гексагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	405,0/407,0
206		4-[(4aS)-7,9-дихлор-2,3,4,4а,5,11-гексагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	438,9/441,0
207		4-[(4aR)-7,9-дихлор-2,3,4,4а,5,11-гексагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	438,8/440,9

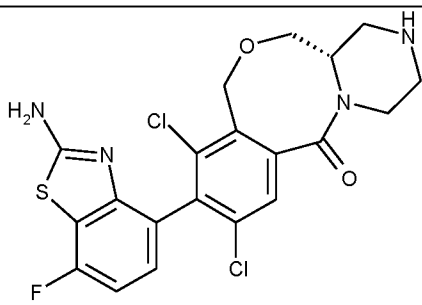
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
208		4[(4aR)-9-хлор-7-фтор-11-оксо-1,2,3,4,4a,5-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	461,0/463,0
209		4-[(13aS)-8-хлор-6-оксо-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	439,0/441,0
210		4-[(3R,13aS)-10хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	489,0/491,0
211		4-[(3S,13aS)-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	489,2/491,2
212		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-11-метил-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-6-он	446,0/448,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
213		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-1,2,3,4,11,12,13,13а-октагідропіразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-6-он	432,0/434,0
214		(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-10-метил-2,3,4,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	447,2/449,2
215		4-[(13aR)-8-хлор-10-метил-1,2,3,4,6,11,13,13а-октагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-9-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	433,2/435,2
216		(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-2,3,4,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	467,2/469,2
217		4-[(13aR)-8,10-дихлор-1,2,3,4,6,11,13,13а-октагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-9-іл]-7-фтор-1,3-бензотіазол-2-амін	453,2/455,2

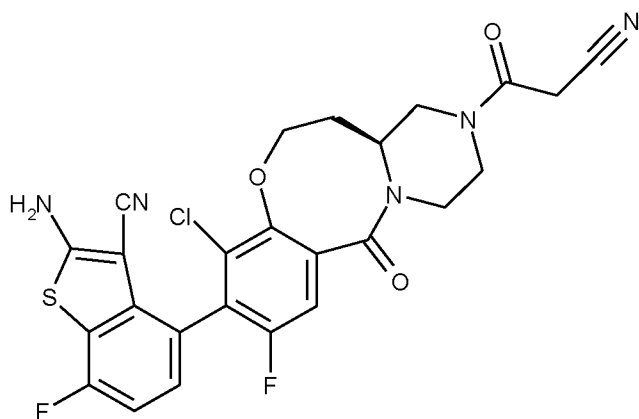
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Препаративної методики 187

Препаративна методика	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
218		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-2,3,4,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	467.2/469,2

Препаративна методика 219

4-[(13aS)-10-Хлор-2-(2-ціаноацетил)-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил

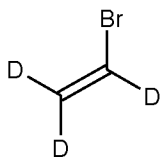
5



Ціанооцтову кислоту (138 мг, 1,61 ммоль), 1-гідроксибензотриазол (222 мг, 1,61 ммоль), DIEA (0,5 мл, 3 ммоль) і гідрохлорид 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодііміду (306 мг, 1,60 ммоль) додавали до суспензії 4-1(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино [2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрилу (500 мг, 1,05 ммоль) у DCM (10 мл). Реакційну суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 18 год. перед розбавленням DCM і промиванням насиченим водним розчином хлориду амонію та насиченим водним розчином хлориду натрію. Органічні речовини сушили над сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок розчиняли у DCM (5 мл), додавали декілька крапель MeOH, потім додавали гексан для осадження продукту. Осад фільтрували для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (410 мг, 72 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 542,4/544,4 [M+H]⁺.

Препаративна методика 220

1-Бром-1,2,2-тридейтеріоетилен



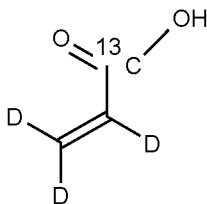
1,2-Диброметан-d₄ (25,0 г, 130,28 ммоль) додавали краплями до розчину гідроксиду калію (15,19г, 243,63 ммоль) у 95 % етанолі-OD (95 мл) і D₂O (5 мл) при 33 °С. Суміш спочатку перемішували при 60 °С протягом 1,5 год., після чого при 63 °С протягом 1,5 год. для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді безбарвного масла, яке безперервно

відганяли з реакційної суміші під час нагрівання, та збирали в приймальну колбу, охолоджувану на бані із сухим льодом і ацетоном (7,3 г, 50 %).

Препаративна методика 221

2,3,3-Тридейтеропрор-2-енова кислота-¹³C

5



10

У колбу поміщали магнієві стружки (1,67 г, 69,71 ммоль), кристал йоду та безводний THF (20 мл). Тим часом готували розчин 1-бром-1,2,2-тридейтеріоетилену (7,3 г, 66,39 ммоль) у безводному THF (30 мл). Суміш, яка містила магній, нагрівали до 50 °C, і додавали порцію розчину вінілброміду (2 мл). Суміш нагрівали при 50 °C, доки не починалася реакція Грін'єра, і суміш не починала кипіти (65 °C). Залишок розчину вінілброміду в THF додавали краплями при 55-65 °C протягом 1,5 год. Одержану суміш гріли при 65 °C протягом 1,5 год. для того, щоб переконатись у завершенні реакції. Цей свіжоприготований розчин (1,2,2-тридейтеріовініл)броміду магнію в THF охолоджували до кімнатної температури, і негайно використовували.

15

20

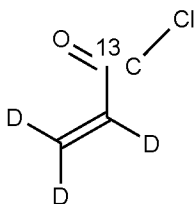
Газоподібний діоксид вуглецю-¹³C барботували через безводний THF (50 мл) при -65 °C протягом 5 хв. Згаданий вище свіжоприготований розчин (1,2,2-тридейтеріовініл)броміду магнію в THF (66,39 ммоль) додавали краплями, при цьому температура реакційної суміші підвищувалася до -20 °C. Суміш нагрівали до -10 °C, і перемішували протягом 10 хв. Суміш додатково барботували діоксидом вуглецю-¹³C протягом 2 хв. Суміш нагрівали до температури навколишнього середовища, і перемішували протягом 10 хв. Додавали спочатку гідрокінон (10 мг) з подальшим додаванням краплями 6М сірчаної кислоти (6,5 мл) для гасіння реакції, підтримуючи температуру нижче 20 °C. Суміш розбавляли діетиловим простим ефіром (400 мл), і додавали сульфат натрію (100 г). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 5 хв, фільтрували, і концентрували in vacuo при температурі у межах від 0 °C до 5 °C для одержання неочищеного продукту (7,5 г) у вигляді жовтого масла. Неочищений продукт очищали вакуумною перегонкою на короткому шляху для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді безбарвної олії (1,2 г, 24 %).

25

30

Препаративна методика 222

2,3,3-Тридейтеропрор-2-енової кислоти хлорид-¹³C



35

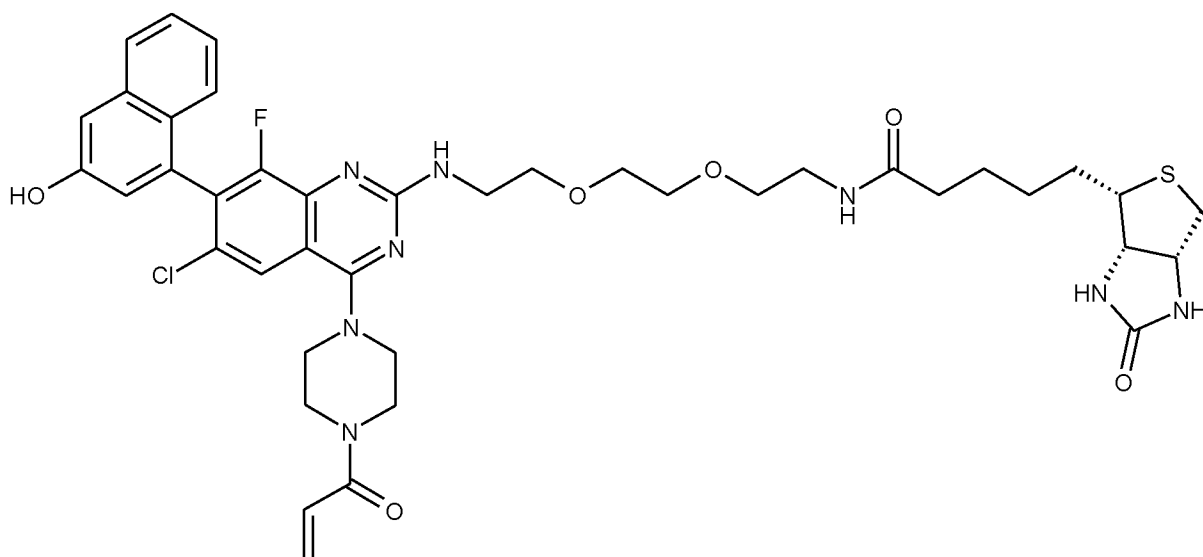
Оксалілхлорид (0,24 мл, 2,85 ммоль) додавали до розчину 2,3,3-тридейтеропрор-2-енової кислоти-¹³C (0,181 г, 2,38 ммоль) і DMF (1 крапля) у безводному DCM (10 мл) при 0 °C, і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год. Вказану в заголовку сполуку використовували безпосередньо на наступному етапі як розчин.

40

Препаративна методика 223

Зонд KRAS

N-(2-{2-[2-({6-хлор-8-фтор-7-(3-гідроксинафталін-1-іл)-4-[4-(проп-2-еноїл)піперазин-1-іл]хіназолін-2-іл}аміно)етокси]етокси}етил)-5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагідро-1H-тієно[3,4-d]ензоксазе-4-іл]пентанамід.



Етап А: трет-Бутил-4-(7-бром-2,6-дихлор-8-фторхіназолін-4-іл)піперазин-1-карбоксилат (0,51г, 1,1 ммоль) та IPA (5 мл) об'єднували у НВЧ-флакони. Додавали DIPEA (0,55 мл, 3,3 ммоль) і 5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагідро-1H-тієно[3,4-d]ензоксазе-4-іл]-N-[2-[2-(2-аміноетокси)етокси]етил]пентанамід (0,48 г, 1,32 ммоль), і суміш нагрівали до 120 °С в мікрохвильовому реакторі протягом 6 год. Після збігання цього часу суміш розбавляли насиченим водним розчином хлориду амонію та 25 % IPA в CHCl₃, і шари розділяли. Органічний шар промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок очищали хроматографією з нормальною фазою, елюючи градієнтом 50-100 % В в А (А: гексани, В: 10 % MeOH в DCM), для одержання трет-бутил-4-{7-бром-6-хлор-8-фтор-2-[(2-{2-[2-((5-(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагідро-1H-тієно[3,4-d]ензоксазе-4-іл)]пентаноїл)аміно)етокси]етокси]етил)аміно}хіназолін-4-іл}піперазин-1-карбоксилату у вигляді жовтої твердої речовини (0,68 г, 78 %). ES/MS m/z: 819 (M+H).

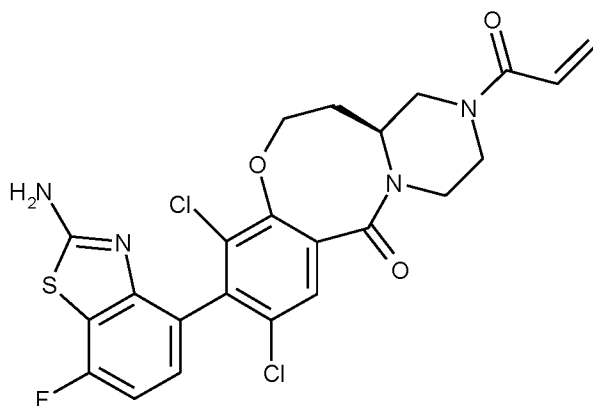
Етап В: об'єднували трет-бутил-4-{7-бром-6-хлор-8-фтор-2-[(2-{2-[2-((5-(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагідро-1H-тієно[3,4-d]ензоксазе-4-іл)]пентаноїл)аміно)етокси]етокси]етил)аміно}хіназолін-4-іл}піперазин-1-карбоксилат (0,30 г, 0,37 ммоль), 1,4-діоксан (4 мл) і воду (0,75 мл). Додавали карбонат калію (0,24 г, 1,11 ммоль), 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)нафталін-2-ол (0,20 г, 0,74 ммоль) і тетракіс(трифенілфосфін)паладій (0) (0,085 г, 0,074 ммоль), і суміш перемішували при 85 °С в атмосфері азоту протягом 12 год. Після збігання цього часу суміш охолоджували до температури навколишнього середовища, і фільтрували для видалення твердих частинок. Фільтрат розбавляли насиченим водним розчином хлориду амонію та EtOAc, і шари розділяли. Органічний шар промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок очищали звичайно-фазовою хроматографією, елюючи градієнтом 90-100 % В в А (А: гексани, В: 10 % MeOH в DCM), для одержання трет-бутил-4-{6-хлор-8-фтор-7-(3-гідроксинафталін-1-іл)-2-[(2-{2-[2-((5-(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагідро-1H-тієно[3,4-d]ензоксазе-4-іл)]пентаноїл)аміно)етокси]етокси]етил)аміно}хіназолін-4-іл}піперазин-1-карбоксилату у вигляді жовтої твердої речовини (0,31 г, 96 %). ES/MS m/z: 881 (M+H).

Етап С: Розчин трет-бутил-4-{6-хлор-8-фтор-7-(3-гідроксинафталін-1-іл)-2-[(2-{2-[2-((5-(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагідро-1H-тієно[3,4-d]ензоксазе-4-іл)]пентаноїл)аміно)етокси]етокси]етил)аміно}хіназолін-4-іл}піперазин-1-карбоксилату (0,31 г, 0,35 ммоль) у MeOH (4 мл) охолоджували до 0 °С. Додавали HCl (3М у MeOH, 6 мл, 17,5 ммоль), і суміш перемішували при 0 °С протягом 30 хв перед витримуванням для нагрівання до температури навколишнього середовища. Через -18 год. реакційну суміш концентрували in vacuo. Залишок розбавляли DCM, і знову концентрували in vacuo. Одержаний залишок розбавляли гексаном, і перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 2 год. Одержану тверду речовину відфільтровували, і сушили in vacuo для одержання гідрохлориду N-{2-[2-(2-{16-хлор-8-фтор-7-(3-гідроксинафталін-1-іл)-4-(піперазин-1-іл)хіназолін-2-іл]аміно)етокси]етокси]етил}-5-[(3aS, 4S, 6aR)-2-оксогексагідро-1H-тієно[3,4-d]ензоксазе-4-

іл]пентанаміду. Цю гідрохлоридну сіль (0,19 г, 0,23 ммоль) нейтралізували шляхом об'єднання з DIEA (0,16 мл, 0,92 ммоль) у DCM (2,5 мл). Суміш охолоджували до -78 °С, і додавали акрилоїлхлорид (0,5М у DCM, 0,4 мл, 0,21 ммоль). Через 30 хв суміш нагрівали до температури навколишнього середовища. Через 1 год. суміш розбавляли MeOH (1 мл), і концентрували *in vacuo*. Одержаний залишок очищали хроматографією з оберненою фазою, елюючи градієнтом 35-60 % В в А (А: 10 мМ водний розчин NH₄HCO₃ з 5 % MeOH; В: ACN), для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (0,027 г, 14 %). ES/MS m/z: 835 (M+H).

Приклад 1

(13aS)-9-(2-Аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-6-он



(13aR)-9-(2-Аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-2,3,4,12,13,13a-гексагідро-1H-піразино[2,1d] [1,5]бензоксазоцин-6-он (500 мг, 1,070 ммоль) розчиняли у DCM (5 мл) і TEA (0,75 мл, 5,4 ммоль). Суміш охолоджували до -78 °С, потім додавали акрилоїлхлорид (0,085 мл, 1,0 ммоль), і суміш перемішували при -78 °С. Через 5 хв додавали декілька крапель ізопропілового спирту при -78 °С, після чого суміш концентрували *in vacuo*, та піддавали хроматографії з оберненою фазою для одержання суміші двох атропізомерів. Суміш атропізомерів розділяли із застосуванням Chiralpak® IC, 4,6 × 150 мм, 40 % EtOH/CO₂, 5 мл/хв, 225 нм. Другу сполуку з колонки ідентифікували як активний атропізомер (165 мг, 55 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 521/523 [M+H]⁺ (>98 % e.e.). Першим з колонки виходив менш активний атропізомер (133 мг, 44 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 521/523 [M+H]⁺ (>98 %; e.e.).

Таблиця 21

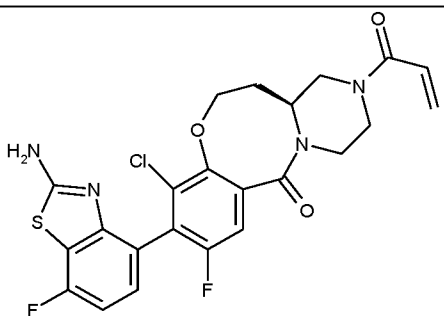
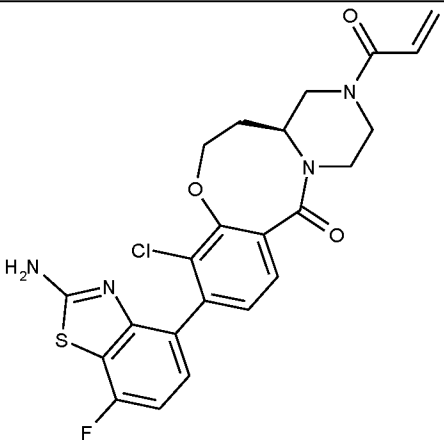
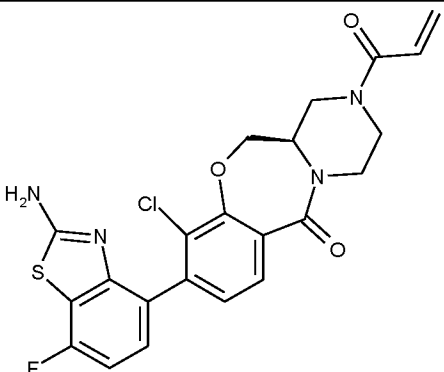
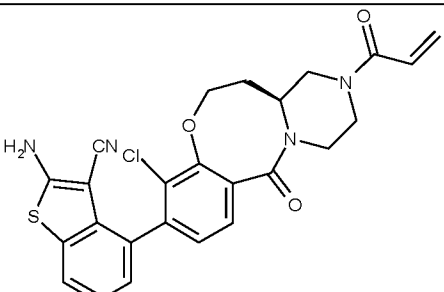
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
2		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7-хлор-9-фтор-3-проп-2-еноїл-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-c] [1,4]бензоксазепін-11-он	491,2/493,2

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
3		1-[(4aS)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7-хлор-9-фтор-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-іл]проп-2-ен-1-он	477,2/479,2
4		4-[(4aR)-9-хлор-7-метил-11-оксо-3-проп-2-еноїл-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	511,0/513,0
5		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-7-метил-3-проп-2-еноїл-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	487,0/489,0
6		(4aR)-8-(2-аміно-3-метилбензотіофен-4-іл)-7-хлор-9-метил-3-проп-2-еноїл-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	493,0/495,0

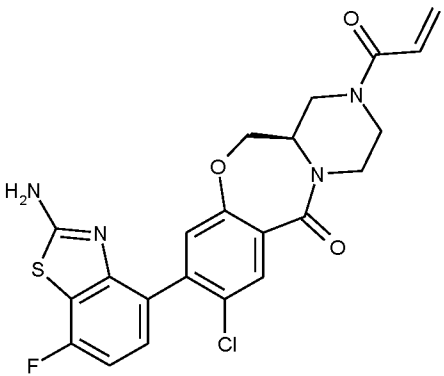
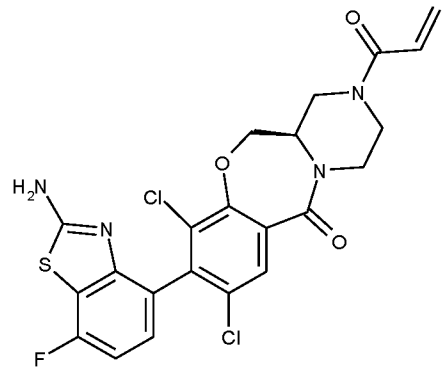
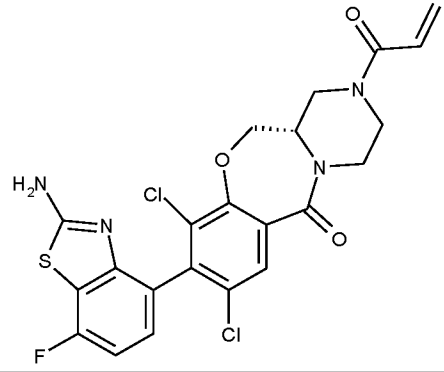
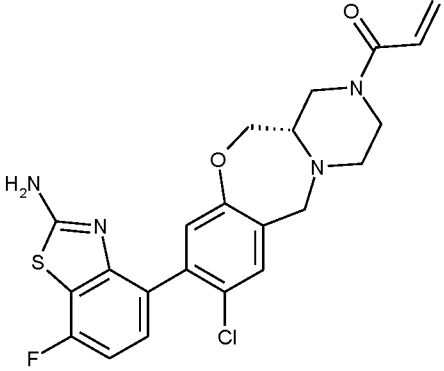
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
7		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-10-хлор-8-фтор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	505,2/507,2
8		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-10-хлор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-6-он	487,0/489,0
9		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7-хлор-3-проп-2-еноїл-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-c][1,4]бензоксазепін-11-он	473,0/475,0
10		4-[(13aS)-10-хлор-6-оксо-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	493,0/495,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
11		4-[(4aS)-7,9-дихлор-3-проп-2-еноїл-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	499,2/501,2
12		4-[(4aR)-7-хлор-9-фтор-11-оксо-3-проп-2-еноїл-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	497,2/499,2
13		(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-6-он	487,0/489,0
14		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-6-он	487,0/489,0

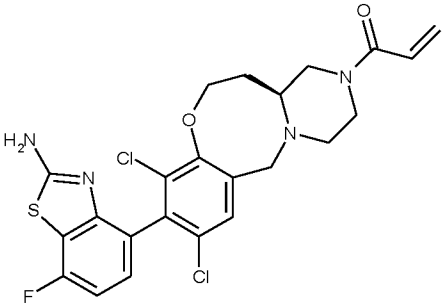
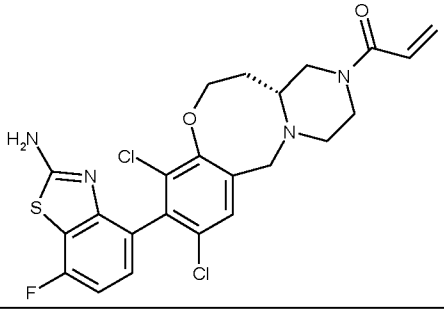
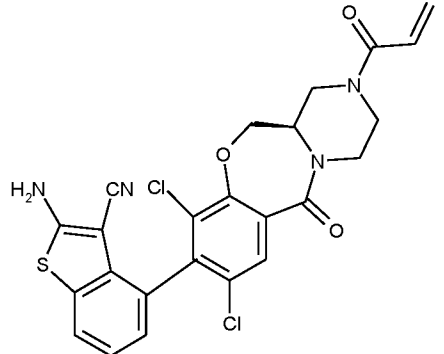
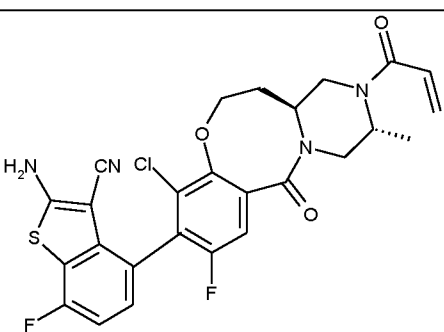
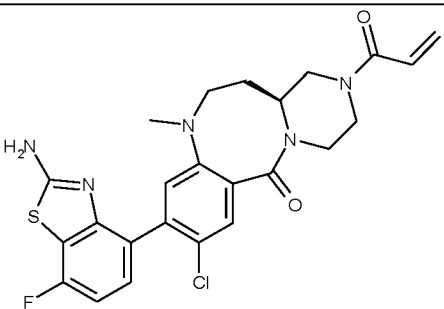
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
15		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-3-проп-2-еноїл-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	473,0/475,0
16		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7,9-дихлор-3-проп-2-еноїл-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	507,0/509,0
17		(4aS)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7,9-дихлор-3-проп-2-еноїл-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	506,9/508,8
18		1-[(4aS)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-іл]проп-2-ен-1-он	459,0/461,0

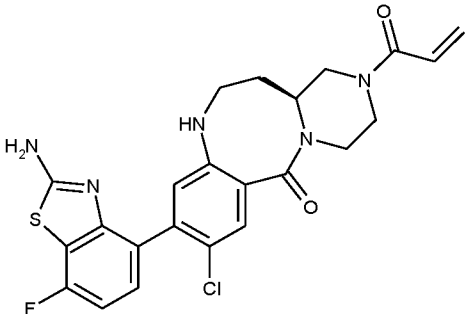
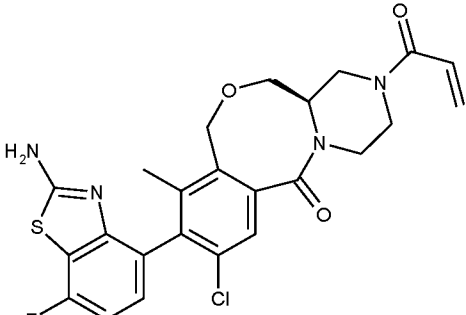
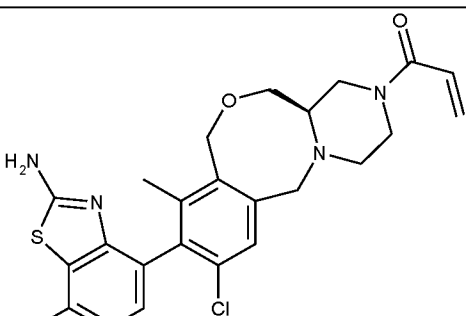
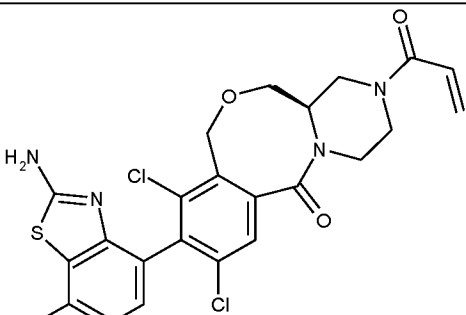
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
19		1-[(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-іл]проп-2-ен-1-он	459,0/461,0
20		1-[(4aS)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7,9-дихлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-іл]проп-2-ен-1-он	493,0/495,0
21		1-[(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7,9-дихлор-1,2,4,4а,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-іл]проп-2-ен-1-он	493,0/495,0
22		4-[(13aS)-8-хлор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-д][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	493,0/495,0

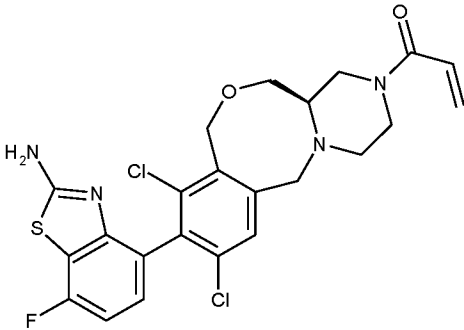
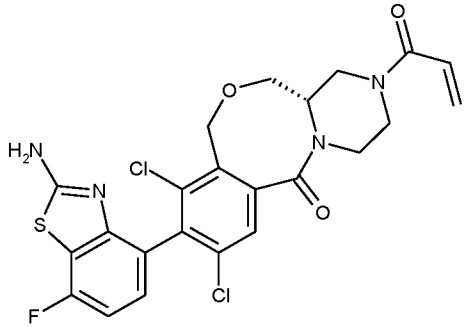
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
23		1-[(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-іл]проп-2-ен-1-он	507,0/509,0
24		1-[(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-3,4,6,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-2-іл]проп-2-ен-1-он	507,0/509,0
25		4-[(4aR)-7,9-дихлор-11-оксо-3-проп-2-еноїл-2,4,4а,5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	513,0/515,0
26		4-[(3R,13aS)-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	543,0/545,0
27		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-11-метил-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-6-он	500,0/502,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
28		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-2-проп-2-еноїл-3,4,11,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][1,5]бензодіазоцин-6-он	486,0/488,0
29		(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-10-метил-2-проп-2-еноїл-1,3,4,11,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	501,0/503,0
30		1-[(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-10-метил-2-проп-2-еноїл-1,3,4,6,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-іл]проп-2-ен-1-он	487,0/489,0
31		(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,11,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	521,2/523,2

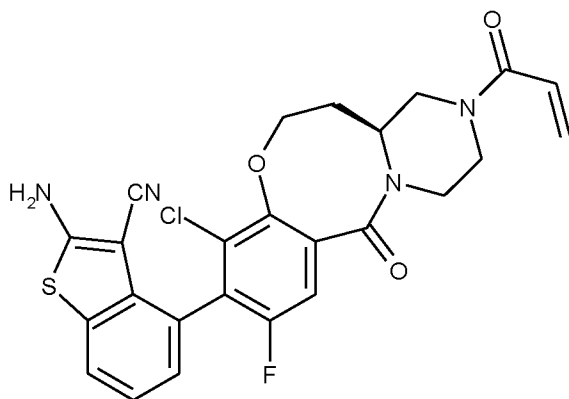
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 1

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
32		1-[(13aR)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-3,4,6,11,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-2-проп-2-ен-1-он	507,0/509,0
33		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8,10-дихлор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,11,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][2,5]бензоксазоцин-6-он	521,0/523,0

У деяких випадках замість TEA використовували DIEA.

Приклад 34

4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил



В суспензію 4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1Н-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрилу (1,58 г, 3,46 ммоль) в EtOAc (35 мл), THF (15 мл) і воді (40 мл) додавали карбонат калію (1,90 г) 13,7 ммоль). Суміш швидко перемішували, і охолоджували до 0 °С. Краплями через краплинну ліжку додавали акрилоїлхлорид у DCM (13,0мл, 3,25 ммоль, 0,25M). Після 10 хв перемішування на льодяній бані суміш розбавляли EtOAc, і виливали у ділильну ліжку. Шари розділяли, і водний шар знову екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні екстракти промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Залишок очищали флеш-хроматографією на колонках із силікагелем, елюючи спочатку 0-100 % (10 % MeOH в DCM)/DCM, після чого 0-100 % [10 % (7 н. NH₃ в MeOH) в DCM]/DCM, для одержання бажаного продукту у вигляді пухкої твердої речовини. Тверду речовину обробляли

ультразвуком в простому ефірі протягом 30 хв, фільтрували, і сушили у високому вакуумі для одержання вказаної в заголовку сполуки (1,60 г, 91 %). ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 511,0/513,0 [M+H]⁺.

Таблиця 22

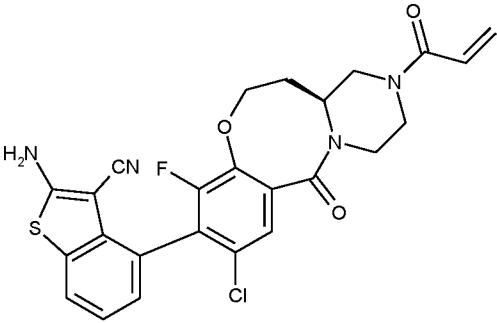
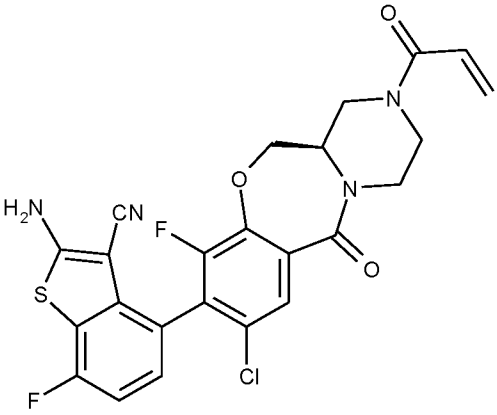
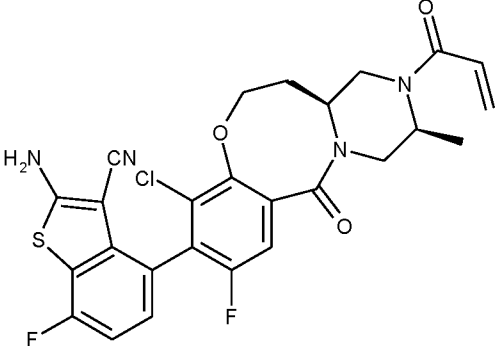
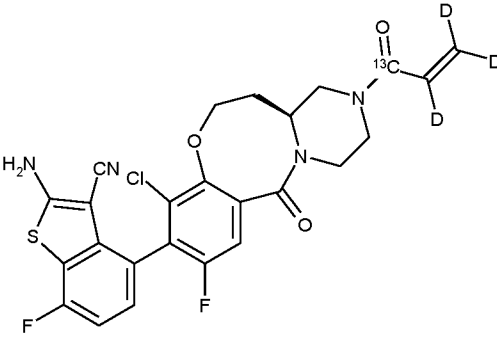
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 34

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
35		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	529,0/531,0
36		4-[(4aR)-7-хлор-9-фтор-11-оксо-3-проп-2-еноїл-2,4,4a, 5-тетрагідро1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	515,0/517,0
37		(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-7-фтор-3-проп-2-еноїл-2,4,4a, 5-тетрагідро-1Н-піразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-11-он	491,0/493,0

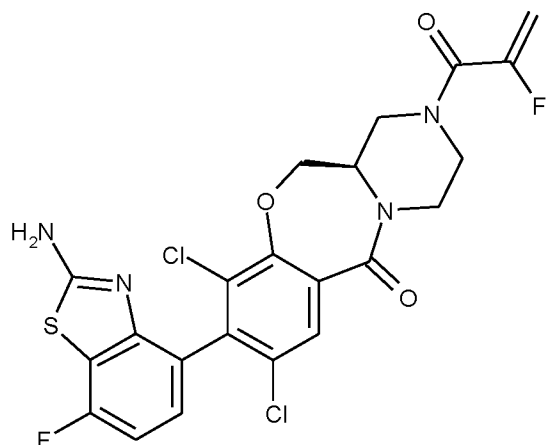
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 34

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
38		1-[(4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][11,4]бензоксазепін-3-іл]проп-2-ен-1-он	477,0/479,0
39		1-[(4aS)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-9-хлор-7-фтор-1,2,4,4a,5,11-гексагідропіразино[2,1-с][1,4]бензоксазепін-3-іл]проп-2-ен-1-он	477,0/479,0
40		4-[(13aS)-8-хлор-10-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноїл-1,5,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	529,0/531,0
41		(13aS)-9-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-8-хлор-10-фтор-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино [2,1 d][1,5]бензоксазоцин-6-он	505,0/507,0

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 34

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
42		4-[(13aS)-8-хлор-10-фтор-6-оксо-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-амінобензотіофен-3-карбонітрил	511,0/513,0
43		4-[(4aR)-9-хлор-7-фтор-11-оксо-3-проп-2-еноїл-2,4,4a,5-тетрагідро-1H-піразино[2,1-c] [1,4]бензоксазепін-8-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	515,0/517,0
44		4-[(3S, 13aS)-10-хлор-8-фтор-3-метил-6-оксо-2-проп-2-еноїл-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино [2,1-d] [1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	542,4/544,4
45		4-1(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2-(2,3,3-тридейтеро-проп-2-еноїл)-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил- ¹³ C	533,1/535,1

Приклад 46



До розчину (4aR)-8-(2-аміно-7-фтор-1,3-бензотіазол-4-іл)-7,9-дихлор-1,2,3,4,4а,5-гексагідропіразино[2,1-с] [1,4]бензоксазепін-11-ону (46 мг, 0,10 ммоль), 2-фторпроп-2-енової
 5 кислоти (11 мг, 0,12 ммоль), DIEA (53 мкл, 0,30 ммоль) у DMF (1 мл), охолодженого на льодяній бані при 0 °С, додавали 50 % (мас.) розчин пропілфосфонового ангідриду в EtOAc (91 мкл, 0,15 ммоль). Через 45 хв реакційну суміш концентрували in vacuo. Неочищену суміш очищали хроматографією з оберненою фазою, елюючи градієнтом 20-80 % В в А (А: 10 мМ водний розчин NH₄HCO₃ з 5 % MeOH; В: ACN), для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді
 10 білої твердої речовини (25 мг, 47 %). ES/MS m/z: 525 (M+H).

Таблиця 23

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 46

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
47		4-[(13aS)-10-хлор-2-[(E)-4,4-дифторбут-2-еноїл]-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино [2,1-d] [1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	579,5/581,4
48		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2-[2-(трифторметил)проп-2-еноїл]-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино [2,1-d] [1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	597,5/599,5

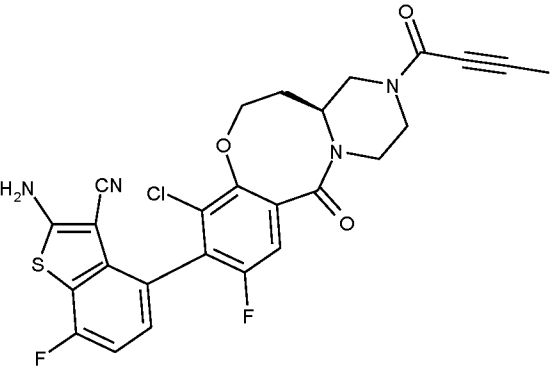
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 46

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
49		4-[(13aS)-10-хлор-2-[(E)-4-(диметиламіно)бут-2-еноїл]-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино [2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	586,6/588,6
50		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-[(E)-4-фторбут-2-еноїл]-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	561,5/563,5
51		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-[(E)-4-гідроксибут-2-еноїл]-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	559,4/561,4
52		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-[2-(гідроксиметил)проп-2-еноїл]-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	559,4/561,4

Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 46

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
53		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-(2-фторпроп-2-еноїл)-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	547,0/549,0
54		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2[(E)-4-метоксибут-2-еноїл]-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	573,6/575,6
55		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-[(E)-4-морфолінобут-2-еноїл]-6-оксо-1,3A12,13,13a-гексагідропіразино [2,1-d][1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	628,6/630,6
56		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-(4-гідроксибут-2-іноїл)-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	557,5/559,4

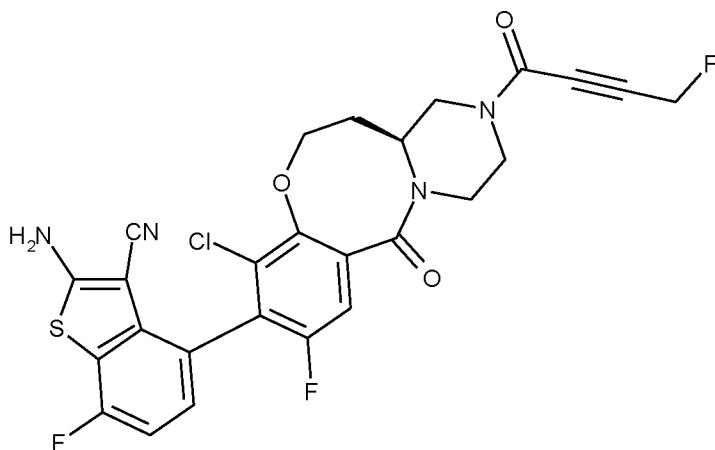
Сполуки, синтезовані методом, по суті аналогічним методу Прикладу 46

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M + H)
57		4-[(13aS)-2-бут-2-іноіл-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино [2,1-d] [1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	541,4/543,4

Приклад 58

4-[(13aS)-10-Хлор-8-фтор-2-(4-фторбут-2-іноіл)-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил

5



Трифторид діетиламіносірки (0,03 мл, 0,2 ммоль) краплями із застосуванням шприца додавали в герметичний флакон, в якому містився розчин 4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-(4-гідроксибут-2-іноіл)-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрилу (0 °C, 120 мг, 0,215 ммоль) у DCE (2 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 30 хв, після чого розбавляли водою і 25 % розчином ІР А/хлороформу. Органічні речовини відокремлювали, сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи 0-100 % 10 % 7M NH₃ в DCM/DCM, і додатково очищали хроматографією з оберненою фазою для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (7 мг, 6 %). ES/MS m/z (³⁵C1/³⁷C1) 559,4/561,4 LM+H]⁺.

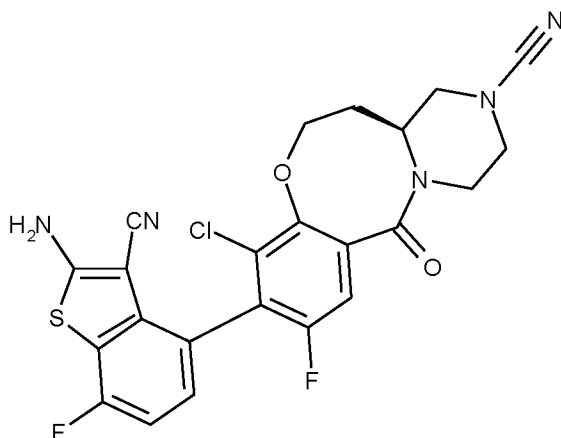
Таблиця 24:

Сполука, синтезована методом, по суті аналогічним методу Прикладу 57

Приклад	Структура	Назва сполуки	ES/MS m/z (M+H)
59		4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-2-[2-(фторметил)проп-2-еноїл]-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5] бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил	561,4/563,5

Приклад 60

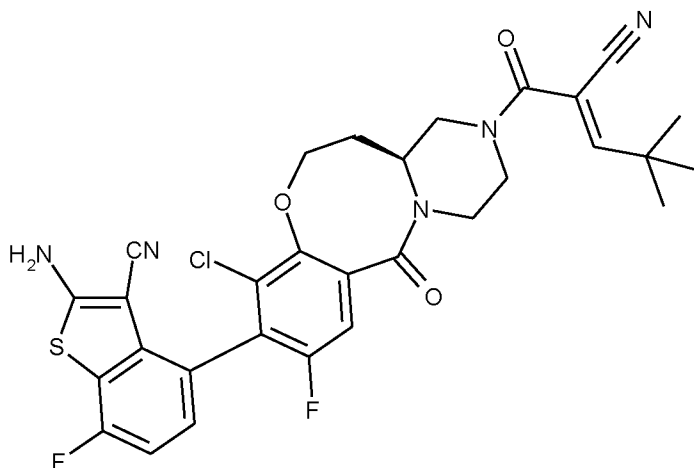
5 (13a8)-9-(2-Аміно-3-ціано-7-фторбензотіофен-4-іл)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5] бензоксазоцин-2-карбонітрил



10 У колбу, в якій містився 4-[(13aS)-10-хлор-8-фтор-6-оксо-2,3,4,12,13,13а-гексагідро-1H-піразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил (100 мг, 0,211 ммоль) і 1 н. NaOH (1 мл) в DCM (1 мл), додавали ціаногенбромід (3М в DCM, 0,15 мл, 0,45 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 18 год., потім розбавляли водою і 25 % розчином IP A/хлороформу. Органічні речовини відокремлювали, сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували, і концентрували in vacuo. Одержаний залишок піддавали хроматографії з оберненою фазою для одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини (29 мг, 27 %). ES/MS m/z (³⁵C1/³⁷C1) 517,0/519,0 [M+H]⁺.

Приклад 61

20 4-[(13aS)-10-Хлор-2-[(E)-2-ціано-4,4-диметилпент-2-еноїл]-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13а-гексагідропіразино[2,1-d][1,5]бензоксазоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил



У 20 мл НВЧ-флакон завантажували 4-[(13aS)-10-хлор-2-(2-ціаноацетил)-8-фтор-6-оксо-1,3,4,12,13,13a-гексагідропіразино[2,1-d] [1,5]бензоксаоцин-9-іл]-2-аміно-7-фторбензотіофен-3-карбонітрил (0,410 г, 0,756 ммоль), EtOH (8 мл), піперидин (0,15 мл, 1,5 ммоль) та триметилацетальдегід (0,7 мл, 6 ммоль), і герметично закривали перегородкою. Реакційну суміш гріли у мікрохвильовому реакторі при 120 °C протягом 60 хв, додатково протягом 90 хв при 120 °C і ще протягом 1 год. при 100 °C перед концентруванням *in vacuo*. Одержаний залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи сумішшю 0-50 % ацетон:DCM для одержання вказаного в заголовку продукту у вигляді блідо-жовтої твердої речовини (117мг, 25 %). ES/MS *m/z* (³⁵C/³⁷ Cl) 610,6/612,6 [M+H]⁺.

Біологічні дослідження

Наведені нижче дослідження демонструють, що наведені як приклад сполуки є інгібіторами KRas G12C та інгібують ріст певних пухлин *in vitro* та/або *in vivo*.

Застосування зонда KRas G12C при проведенні дослідження на основі TR-FRET

Метою цього дослідження є визначення здатності інгібітора конкурувати з зондом за зв'язування та ковалентне модифікування KRas G12C на кодоні 12. Сигнал генерується шляхом перенесення енергії флуоресценції з роздільною здатністю у часі між європієм на антитілі проти KRas G12C, зв'язаному з міченим європієм антитілом до His-мітки LanthaScreen, і флуоресцентною міткою Tracer 647 (Alexa Fluor™), зв'язаною з KRas G12C через стрептавідин та біотинілований інгібітор ("Зонд KRas", дивись Препаративну методику 223).

Інгібітори тестували у форматі відповіді на дозу з 10 mM вихідних розчинів у 100 % DMSO, Для розведення та перенесення 100 нл на лунку, в якій містилося 10-точкове, 2,8-кратне серійне розведення, на аналітичний планшет використовували Labcyte Echo® 555. Два аналітичні планшети готували для визначення ефективності через 5 хв і 60 хв інкубування інгібітора з KRas G12C. His-мічений KRas G12C (20 nM) на планшети додавали в аналітичному буфері (20 mM Трис-НCl, pH 7,5, 0,01 % TX-100 і 1 mM DTT). Після 5 хв або 60 хв інкубування додавали 1 мкМ зонда Kras, і надавали можливість ковалентно модифікувати вільний KRas G12C протягом 1 год. Його піддавали 4-кратному розведенню в буфері, який містив мічене європієм антитіло до His-мітки та сенсibilізовану стрептавідином флуоресцентну мітку Tracer 647 (обидва від Life Technologies) для одержання KRas G12C (5 nM), анти-His антитіла (2 nM), зонда KRas (300 nM) і сенсibilізованої стрептавідином мітки Coated Tracer 647 (500 nM). Через 30 хв флуоресцентний сигнал зчитували на планшет-рідері Envision' (збудження при 340 nM, випромінювання маркера (em) при 665 nM і емісія антитіл при 615 nM). У максимальних контрольних лунках відсутні інгібітори, а в мінімальних контрольних лунках відсутні як інгібітор, так і KRas G12C. Відношення сигналу (em при 665/em при 615) перетворюється на відсоток інгібування за таким рівнянням: % інгібування=100-[(Сигнал експериментальної сполуки - медіанний мінімальний сигнал)/(медіанний максимальний сигнал - медіанний мінімальний сигнал)х100]. IC₅₀ визначали шляхом підгонки відсотка інгібування при кожній концентрації інгібітора до чотирипараметричного нелінійного логістичного рівняння із застосуванням Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$, де y - % інгібування, A - мінімальна асимптота, B - максимальна асимптота, C - відносна IC₅₀ або концентрація інгібітора, яка викликає 50 % інгібування в межах встановленого діапазону обох асимптот, і D - кутовий коефіцієнт Хіл्ला.

Сполуки в рамках цього винаходу оцінювали в цьому дослідженні по суті так, як описано вище. Наведені як приклад сполуки за цим винаходом, оцінені в цьому дослідженні, демонстрували інгібіторну активність щодо KRas G12C, конкуруючи з зондом за зв'язування та

ковалентне модифікування KRas G12C на кодоні 12. Сполука Прикладу 1, наприклад, яка була оцінена в цьому дослідженні, продемонструвала IC₅₀ менше ніж 0,015 мкМ, через 5 хв і 60 хв, n=4.

Дослідження AlphaLISA® для кількісного визначення фосфо-ERK в клітинах H358

Метою цього дослідження є визначення здатності досліджуваних сполук інгібувати фосфорилювання p-ERK1/2, низхідного ефектора KRas у клітинах раку легенів людини H358 (ATCC CRL-5807). Стисло, дослідження AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) являє собою сендвіч-імуноферментне дослідження для кількісного визначення фосфо-ERK 1/2 (фосфорилюваного на Thr202/Tyr204 в ERK1 або Thr185/Tyr187 в ERK2) в клітинних лізатах з використанням технології Alpha (Perkin Elmer, номер за каталогом ALSU-PERK-A50K).

Клітини H358 висівали з розрахунку 40К клітин на лунку в 100 мкл середовища (RPMI 1640, GIBCO, номер за каталогом 22400-071), яке містило 10 % FBS (GIBCO, номер за каталогом: 10082-147) на 96-лункові планшети (Costar № 3596), і поміщали в інкубатор на ніч у вологих лотках при 37 °C, 5 % ССЬ. Наступного ранку 10 мкл серійно розведених (у 3 рази) досліджуваних сполук (максимальна концентрація 50 мкМ) і 10 мкл контролю (Максимальні сигнальні лунки: 5 % DMSO та Мінімальні сигнальні лунки: 2 мкМ N-(3-{3-циклопропіл-5-[(2-фтор-4-йодфеніл)аміно]-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагідропіридо[4,3-D]піримідин-1(2H)-іл}феніл)ацетаміду (траметиніб як позитивний контроль)) додавали на планшет для клітинних культур, та інкубували протягом 2 год. у вологих лотках при 37 °C/5 % CO₂. Лізисний буфер готували при температурі навколишнього середовища; він містив протеазу і коктейль інгібіторів протеаз. Культуральне середовище видаляли шляхом перевертання та струшування планшета для клітинних культур в раковині з подальшим промоканням паперовим рушником. Лізисний буфер додавали до планшета для клітинних культур (50 мкл на лунку), і планшет інкубували при температурі навколишнього середовища протягом 10 хв на шейкері. Для визначення p-ERK акцепторні гранули розводили у суспензійній суміші з буфером. Із застосуванням рідинного маніпулятора STARlet 5 мкл акцепторних гранул і 2 мкл клітинного лізату переносили шляхом одноетапного розведення у наконечнику дозатора на 384-лунковий аналітичний планшет. Аналітичний планшет герметизували фольгою, та інкубували при температурі навколишнього середовища протягом 2 год. Донорні гранули розводили у суспензійній суміші з буфером. Використовуючи STARlet, 5 мкл донорних гранул додавали на аналітичний планшет, який потім герметизували, загортаючи фольгою. Планшет інкубували при температурі навколишнього середовища протягом 2 год. у темряві. Потім аналітичний планшет зчитували із застосуванням планшет-рідера EnVision™ (Perkin Elmer), використовуючи програму люмінесценції.

Сигнал перетворювали на відсоток інгібування за таким рівнянням: % інгібування=100-[(Сигнал експериментальної сполуки - медіанний мінімальний сигнал) / (медіанний максимальний сигнал - медіанний мінімальний сигнал) x 100]. Максимальний сигнал - контрольна лунка без інгібітора. Мінімальний сигнал - контрольна лунка, в якій містився еталонний інгібітор, достатній для повного пригнічення активності. IC₅₀ визначали шляхом підгонки відсотка інгібування при кожній концентрації інгібітора до чотирипараметричного нелінійного логістичного рівняння із застосуванням Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$, де y - % інгібування, A - мінімальна асимптота, B - максимальна асимптота, C - відносна IC₅₀ або концентрація інгібітора, яка викликає 50 % інгібування в межах встановленого діапазону обох асимптот, і D - кутовий коефіцієнт Хілла.

Сполуки в рамках цього винаходу оцінювали в цьому дослідженні по суті так, як описано вище. Сполуки Прикладів демонстрували здатність інгібувати фосфорилювання p-ERK1/2. Наприклад, сполука Прикладу 1 демонструвала відносну IC₅₀ у цьому дослідженні, яка становила 0,00178 мкМ n=3. Ці дані показали, що сполуки Прикладів виявляли активність інгібування KRas G12C у цьому клітинному дослідженні.

Дослідження ELISA на інгібування активності RAS GTPase в клітинах H358

Метою цього дослідження є визначення здатності досліджуваних сполук інгібувати конститутивну активність ГТФази RAS у клітинах раку легенів людини H358 (ATCC CRL-5807). Набір RAS GTPase ELISA (Active Motif, номер за каталогом 52097) включав в себе 96-лунковий планшет, попередньо сенсibiliзований глутатіоном для захоплення білка GST-Raf-RBD, який надався в наборі. Активованій RAS (GTP-зв'язаний) в клітинних екстрактах специфічно зв'язувався з Raf-RBD. Зв'язаний RAS виявляли з використанням першого антитіла, яке розпізнавало людський KRas. Друге антитіло, кон'юговане з HRP (пероксидаза з хрому), розпізнавало перше антитіло, і розчин для проявлення забезпечував хемілюмінесцентне зчитування.

Клітини H358 висівали з розрахунку 80000 клітин/лунка в 90 мкл безсироваткового середовища (RPMI 1640, GIBCO), та інкубували протягом ночі при 37 °C/5 % CO₂. Наступною ранку 10 мкл серійно розведених (у Зрази) досліджуваних сполук (максимальна концентрація 500 мкМ) і 10 мкл контролю (Максимальні сигнальні лунки: 5 % DMSO та Мінімальні сигнальні лунки: 500 мкМ H446-хлор-8-фтор-7-(3-гідрокси-1-нафтил)хіназолін-4-іл]піперазин-1 -іл]проп-2-ен-1-ону, WO2015054572 у як інгібітор) додавали на планшет для клітинних культур, та інкубували протягом 2 год. при 37 °C/5 % CO₂. Готували лізисний/зв'язувальний буфер повного складу, який містив коктейль інгібіторів протеаз та GST-Raf-RBD, і зберігали на льоду. За 1 год. до завершення інкубування планшета для клітинних культур в лізисному/зв'язувальному буфері розводили 50 мкл GST-Raf-RBD, і буфер додавали на аналітичний планшет для проведення ELISA, і інкубували протягом 1 год. при 4 °C з обережним погодюванням. Через 2 год. клітини промивали 100 мкл PBS, який мав температуру танення льоду, і лізували 100 мкл лізисного/зв'язувального буфера. Планшет для клітинних культур струшували протягом 10 хв при температурі навколишнього середовища. Потім планшет для клітинних культур центрифугують при 1500об/хв протягом 10 хв при температурі навколишнього середовища. Протягом цього часу при температурі навколишнього середовища Готували 1х промивний буфер, який у подальшому використовували для промивання (3 × 100 мкл) аналітичного планшета, сенсibilізованого GST-Raf-RBD. Після промивання на аналітичний планшет, сенсibilізований GST-Raf-RBD, додавали 50 мкл клітинного лізату, та інкубували протягом 1 год. при температурі навколишнього середовища з обережним струшуванням. Протягом цього інкубаційного періоду Готували їх буфер для зв'язування антитіл, і доводили його до температури навколишнього середовища. Аналітичний планшет промивали 3 × 100 мкл їх промивним буфером, після чого додавали 50 мкл першого антитіла (розведеного 1:500 в їх буфері для зв'язування антитіл). Планшет інкубували протягом 1 год. при температурі навколишнього середовища. Аналітичний планшет промивали 3 × 100 мкл їх промивним буфером, після чого додавали 50 мкл другого антитіла (розведеного 1:5000 в їх буфері для зв'язування антитіл), та інкубували протягом 1 год. при температурі навколишнього середовища. Аналітичний планшет промивали 4 × 100 мкл їх промивним буфером, після чого при температурі навколишнього середовища додавали 50 мкл хемілюмінесцентного робочого розчину. Після цього аналітичний планшет зчитували із застосуванням планшет-рідера EnVision (Perkin Elmer), використовуючи програму люмінесценції.

Сигнал перетворювали на відсоток інгібування за таким рівнянням: % інгібування=100-[(Сигнал досліджуваної сполуки - медіанний мінімальний сигнал)/(медіанний максимальний сигнал - медіанний мінімальний сигнал)х100]. Максимальний сигнал контрольна лунка без інгібітора. Мінімальний сигнал контрольна лунка, в якій містився еталонний інгібітор, достатній для повного пригнічення активності. IC₅₀ визначали шляхом підгонки відсотка інгібування при кожній концентрації інгібітора до чотирипараметричного нелінійного логістичного рівняння із застосуванням Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$, де у - % інгібування, А - мінімальна асимптота, В - максимальна асимптота, С - відносна IC₅₀ або концентрація інгібітора, яка викликала 50 % інгібування в межах встановленого діапазону обох асимптот, і D - кутовий коефіцієнт Хілла.

Сполуки в рамках цього винаходу оцінювали в цьому дослідженні по суті так, як описано вище. Сполуки Прикладів продемонстрували здатність інгібувати конститутивну активність RAS GTPase. Наприклад, сполука Прикладу 1 продемонструвала відносну IC₅₀ у цьому дослідженні, яка становила 0,00672 мкМ, n=3. Ці дані показали, що сполуки Прикладів виявляють активність інгібування Kras-GTP у цій культурі клітин раку легенів людини.

3D-дослідження проліферації клітин H358

Метою цього дослідження є оцінювання здатності інгібування досліджуваної сполуки в тривимірному дослідженні проліферації з використанням клітин раку легенів людини H358 (ATCC CRL-5807). Сигнал, який відображає проліферацію клітин, виявляли з використанням реагенту CellTiterGlo® 3D (Promega G9683). Клітини вирощували у середовищі RPMI 1640 (GIBCO®), доповненому 10 % термоінактивованої FBS та 0,1 мг/мл пеніциліну/стрептоміцину. Клітини H358 культивували у фазі росту, і п'ять тисяч клітин на лунку висівали на круглодонний прозорий 96-лунковий планшет з чорними лунками та наднизьким рівнем прикріплення (Corning®, номер за каталогом 4520) з 80 мкл/лунка культурального середовища. Клітини інкубували протягом ночі при 37 °C у вологій камері. На планшет додавали 20 мкл/лунка серійно розведеної досліджуваної сполуки, після чого планшет далі інкубували протягом 96 год. Планшет доводили до температури навколишнього середовища, і додавали рівний об'єм реагенту CellTiterGlo® 3D з температурою навколишнього середовища. Планшет струшували зі швидкістю 750 об/хв протягом 10 хв при температурі навколишнього середовища. Після 1 год.

інкубування при температурі навколишнього середовища для стабілізації сигналу, люмінесцентний сигнал зчитували із застосуванням планшет-рідера EnVision™. Сигнал перетворювали на відсоток інгібування за таким рівнянням: % інгібування = $100 - \left[\frac{\text{Сигнал досліджуваної сполуки} - \text{медіанний мінімальний сигнал}}{\text{медіанний максимальний сигнал} - \text{медіанний мінімальний сигнал}} \times 100 \right]$. Максимальний сигнал контрольна лунка без інгібітора. Мінімальний сигнал - контрольна лунка, в якій містився еталонний інгібітор (траметиніб), достатній для повного пригнічення проліферації клітин. IC₅₀ визначали шляхом підгонки відсотка інгібування при кожній концентрації інгібітора до чотирипараметричного нелінійною логістичного рівняння із застосуванням Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$, де у % інгібування, А мінімальна асимптота, В максимальна асимптота, С - відносна IC₅₀ або концентрація інгібітора, яка викликає 50 % інгібування в межах встановленого діапазону обох асимптот, і D - кутовий коефіцієнт Хілпа.

Сполуки в рамках цього винаходу оцінювали в цьому дослідженні по суті так, як описано вище. Наприклад, сполука Прикладу 1 продемонструвала відносну IC₅₀ у цьому дослідженні, яка становила 0,0083 мкМ, η = 3. Ці дані показали, що сполука Прикладу 1 пригнічує проліферацію клітин раку легень людини H358.

Дослідження проліферації клітин CellTiterGlo®

Метою цього дослідження є оцінювання росту KRas G12C мутантних пухлинних ліній після оброблення досліджуваною сполукою. Зібрана панель ліній пухлинних клітин, які містили KRas G12C або інші мутації KRas (Таблиця 25). Усі клітинні лінії одержані від ATCC або з інших згаданих джерел. Зазвичай клітини культивували у середовищі RPMI1640 або модифікованому за способом Дульбекко середовищі Ігла (DMEM, GIBCO), доповненому 10 % FBS (GIBCO, Invitrogen). Для одержання двовимірної системи (2D), клітини (4 × 10³/лунка), які підтримували у ростовому середовищі, описаному вище, висаджували на 96-лункові планшети для культур тканин (Corning®, номер за каталогом 3603) за день до оброблення. Клітини обробляли сполукою протягом 96 год., після чого досліджували на життєздатність із застосуванням набору CellTiterGlo® Luminescent Cell Viability Assay® (Promega, номер за каталогом G7572 для 2D) відповідно до інструкцій виробника та планшет-рідера EnVision. Для розрахунку половини максимальної інгібувальної концентрації (IC₅₀) із застосуванням програми GraphPad Prism 4® використовували криві нелінійної регресії та сигмоїдальної залежності "доза-ефект".

Таблиця 25

Антипроліферативна активність in vitro сполук Прикладу 1 й Прикладів 34-36 на панелі KRas G12C мутантних пухлинних ліній клітин

Клітинна лінія	Приклад 1		Приклад 34		Приклад 35		Приклад 36	
	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
H358 (легені)	94,5	0,004	95,6	0,002	96,4	0,002	89,1	0,008
SW1463 (товста кишка)	95,3	0,006	90,1	0,004	94,3	0,005	82,7	0,014
MiaPaca-2 (підшлункова залоза)	77,2	0,018	82,9	0,01	85,8	0,011	79,6	0,081
H23 (легені)	98,2	0,045	96,8	0,026	98	0,024	96,7	0,1
LU99 (легені)	89,9	0,303	91,9	0,201	96,6	0,173	99,1	0,349
SW837 (пряма кишка)	60,8	0,25	59,6	0,2	64,2	0,33	58,7	0,57
HCC44 (легені)	46,4	>10	41	>10	64,3	2,23	80,6	2,839
LXFA-983L (легені)	78,6	3,609	68,8	>10	83,1	>10	88	>10
H2122 (легені)	80,4	1,17	78,1	0,66	79,7	0,9	92,8	1,36

Антипроліферативна активність in vitro сполук Прикладу 1 й Прикладів 34-36 на панелі KRas G12C мутантних пухлинних ліній клітин

Клітинна лінія	Приклад 1		Приклад 34		Приклад 35		Приклад 36	
	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)	% інгібування @ 10 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
SW756 (шийка матки)	51,9	1,63	56,9	1,08	56,7	1,55	58,1	2,52
Calu-1 (легені)	45,4	>10	50,6	1,14	56	0,48	77,4	2,925
H1792 (легені)	63,6	3,011	56,7	4,354	81,7	1,41	97,4	2,032
UM-UC-3 (сечовий міхур)	54,3	0,73	56,1	0,51	80,4	1,09	91,6	1,86
KYSE-410 (стравохід)	64,6	5,84	63,2	>10	68,3	7,974	43,1	>10
H1373 (легені)	68,8	1,813	67,7	6,739	86,3	3,544	82,6	5,494
SW1573 (легені)	35	>10	60,8	7,823	44,7	>10	54,3	9,35
H2030 (легені)	32,9	>10	41,1	>10	40,3	>10	55,8	>10
A549 (легені)	19,1	>10	18,8	>10	31,6	>10	62,1	9,5

Дані вказують на те, що сполуки Прикладу 1 й Прикладів 34-36 пригнічують ріст багатьох KRas G12C мутантних пухлинних клітинних ліній, наведених у Таблиці 26.

5 Як підсумовано в Таблиці 25, сполуки Прикладу 1 й Прикладів 34-36 виявляли антипроліферативну активність у більшості пухлинних клітин з мутацією KRas G12C в умовах 2D-культури. У клітинах A549 з мутацією KRas G12S сполуки Прикладу 1 й Прикладів 34-36 виявляли незначну активність, що свідчить про те, що сполуки Прикладу 1 й Прикладів 34-36 селективно інгібують пухлинні клітини з мутацією KRas G12C.

10 Інгібування фармакодинамічних (PD) маркерів KRas G12C у ксенотрансплантатній моделі H358 та ксенотрансплантатній моделі раку підшлункової залози MiaPaca-2

15 Метою цих досліджень є оцінювання цільового інгібування in vivo перорально введеної досліджуваної сполуки. Клітини H358 раку легень людини або клітини MiaPaca-2 раку підшлункової залози імплантують у ксенотрансплантатні моделі пухлин у "голих" мишей. Клітини H358 або MiaPaca-2 (10x10⁶ у суміші Matrigel® 1:1, загальний об'єм 0,2 мл) імплантували шляхом підшкірної ін'єкції в задню лапу "голих" мишей-сamicь (Harlan Laboratories). В кожній групі використовували всього 3-4 миші для цільового залучення і дослідження PD. Оброблення починали з перорального введення (через шлунковий зонд) досліджуваної сполуки або носія (20 % Captisol®, 25 мМ розчин фосфату, pH 2,0 в 0,2 мл), коли розмір пухлини досягав приблизно 300 мг.

20 Для цільового інгібування мішені in vivo та дослідження PD пухлини розтирали товкачиком у ступці на сухому льоду, і фрагменти пухлини додавали до 800 мкл лізисного буфера, який містив 1 % Triton™ X-100, 25 мМ Трис, pH 7,5, 150 мМ хлориду натрію, 1 мМ EDTA та 1 мМ EGTA з фосфатазою Halt та коктейлем інгібіторів протеаз (Thermo Scientific, номер за каталогом 1861281), у пробірках лізувальної матриці D (MP Biomedical®, номер за каталогом 6913-500) з однією додатковою великою кулькою (MP Biomedical®, керамічна кулька 1/4" (6,35 мм), номер за каталогом 6540-412) на пробірку. Фрагменти пухлини гомогенізували у гомогенізаторі Thermo Bio 101® fast prep (FP120) при уставці 4 протягом 15 хв у холодному стані в цілому 2 рази. Лізати центрифугували при 14000 об/хв протягом 10 хв при 4 °C. Оцінювання білка проводили на супернатанті лізату із застосуванням білкового дослідження BioRad Dc®, і лізати розводили у лізисному/зв'язувальному буфері повного складу з набору Ras GTPase Chemi ELISA Kit® (Active Motif, номер за каталогом 52097). Активний KRas ELISA виконували таким чином: лунки для

ELISA, сенсibilізовані глутатіоном, інкубували з розведеним RAF1-GST в лізисному/зв'язувальному буфері повного складу протягом 1 год. при 4 °C з обережним перемішуванням. Лунки тричі промивали промивним буфером, в кожну лунку додавали по 100 мкг лізатів, і інкубували при температурі навколишнього середовища протягом 1 год. при помірному перемішуванні. Лунки додатково промивали 3 рази, потім до кожної лунки додавали перше антитіло, розведене в буфері, який зв'язував антитіла. Планшети інкубували протягом 1 год. Лунки промивали ще 3 рази перед додаванням до кожної лунки другого антитіла, кон'югованого HRP, розведеного в буфері, який зв'язував антитіла. Планшети інкубували при температурі навколишнього середовища протягом 1 год. Лунки ELISA промивали 4 рази, додавали хемілюмінесцентний реагент, після чого зчитували люмінесценцію. Для pERK Meso Scale Discovery ELISA використовували 25 мкг білка, який містив 0,1 % SDS (додецилсульфату натрію); набір Meso Scale Discovery Whole Cell Lysate Kit для pERK наданий Meso Scale Discovery.

Дозозалежне інгібування мішені in vivo та фармакодинамічні ефекти у ксенотрансплантатній моделі H388 раку легенів:

Метою цього дослідження є оцінювання дозозалежного інгібування мішені in vivo та фармакодинамічних ефектів у моделі раку легенів. Досліджувану сполуку вводили в мишачу ксенотрансплантатну модель раку легенів H358 в діапазоні доз від 12,5 мг/кг до 100 мг/кг. Зразки пухлини відбирали через 8 год. після разової дози. Готували пухлинні лізати, та визначали інгібування pERK та активного KRas, як описано вище. Результати наведені в Таблиці 26; сполука Прикладу 34 продемонструвала дозозалежне інгібування pERK і активного KRas після оброблення разовою дозою від 12,5 мг/кг до 100 мг/кг через 8 год. Сполука Прикладу 35 також продемонструвала хороше інгібування pERK і активного KRas після оброблення разовою дозою від 12,5 мг/кг до 100 мг/кг. При цих рівнях доз спостерігалася інгібування pERK на рівні 82,2 %-90,6 % і активне інгібування KRas на рівні 73,4 %-94 %.

Таблиця 26

Дозозалежне інгібування pERK, pMEK та активного Kras у ксенотрансплантатній мишачій моделі H358

Сполука	Доза (мг/кг)	Час	% інгібування активного RAS	% інгібування pERK
Носій Приклад 35	0	8	0	0
	12,5	8	81	82,2
	25	8	73,4	85,3
	50	8	94	90,6
	100	8	91,9	88,9
Приклад 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

Часозалежне інгібування мішені in vivo та фармакодинамічні ефекти у ксенотрансплантатній моделі H388 раку легенів:

Метою цього дослідження є оцінювання часозалежного інгібування мішені in vivo та фармакодинамічних ефектів у моделі раку легенів. Сполуки Прикладу 35 і Прикладу 36 також вводили у дозі 30 мг/кг у дослідженні зі зміною за часом. Після разової дози зразки пухлини збирали через 2 год., 4 год., 8 год., 12 год. та 24 год. після введення. Пухлинні лізати готували та інгібування pERK і активного Kras визначали так, як описано вище. Результати наведені в Таблиці 27. Сполука Прикладу 35 продемонструвало часозалежне інгібування pERK та активного KRas після оброблення разовою дозою 30 мг/кг. При дозі 30 мг/кг через 8 год. спостерігалася інгібування pERK на рівні 82,6 %, а через 24 год. інгібування pERK зменшувалося до рівня 65,2 %. Для активного KRas через 8 год. досягалася інгібування на рівні 80,2 %, а через 24 год. інгібування активного KRas зменшувалося до рівня 54,9 %. Сполука Прикладу 36 також продемонструвала часозалежне інгібування pERK та активного KRas після разового оброблення у дозі 30 мг/кг. При дозі 30 мг/кг через 8 год. спостерігалася інгібування pERK на рівні 82,6 %, а через 24 год. інгібування pERK зменшувалося до рівня 48,8 %. Для активного KRas через 8 год. досягалася інгібування на рівні 88,5 %, а через 24 год. активне інгібування KRas зменшувалося до рівня 43,2 %.

Таблиця 27

Часозалежне інгібування pERK та активного K_{Ras} у моделі H358

Сполука	Доза (мг/кг)	Час(год.)	% інгібування активного Ras	% інгібування pERK
Носій	0	4 або 8	0	0
Приклад 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
Приклад 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

Інгібування мішені *in vivo* та фармакодинамічні ефекти у ксенотрансплантатній мишачій моделі MiaPaca-2 раку підшлункової залози:

- Метою цього дослідження є оцінювання дозозалежного та часозалежного інгібування мішені та фармакодинамічних ефектів *in vivo* у моделі раку підшлункової залози. Сполуку Прикладу 35 при проведенні дослідження зі зміною за часом вводили у дозі 5 мг/кг, 10 мг/кг або 30 мг/кг. Після разової дози зразки пухлини збирали через 2 год., 4 год., 8 год., 12 год. та 24 год. після введення. Пухлинні лізати готували, і інгібування pERK та активного K_{Ras} визначали так, як описано вище. Результати наведені в Таблиці 28. Сполука Прикладу 35 продемонструвала дозозалежне та часозалежне інгібування pERK та активного K_{Ras} після оброблення разовою дозою 5 мг/кг, 10 мг/кг або 30 мг/кг. При дозі 5 мг/кг через 4 год. спостерігалось інгібування активного Ras на рівні 63,8 % і інгібування pERK на рівні 50,9 %. При дозі 10 мг/кг через 4 год. спостерігалось інгібування активного Ras на рівні 85,5 % і інгібування pERK на рівні 58,5 %. При дозі 30 мг/кг через 4 год. спостерігалось інгібування активного Ras на рівні 90,9 % і інгібування pERK на рівні 58,7 %, а через 24 год. інгібування активного Ras зберігалось на рівні 60,7 %.

Таблиця 28

Дозозалежне і часозалежне інгібування pERK та активного K_{Ras} у моделі MiaPaca-2

Доза (мг/кг)	Час оброблення (год.)	% інгібування активного RAS	% інгібування 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

Активність щодо протипухлинного росту у ксенотрансплантатній мишачій моделі H358 раку легенів:

- Метою цього дослідження є визначення протипухлинної активності досліджуваних сполук (Приклад 34, Приклад 35 і Приклад 36) у ксенотрансплантатній мишачій моделі H358 раку легенів. Клітини пухлини легенів H358 (10 × 10⁶) імплантували шляхом підшкірної ін'єкції в

задню ногу "голих" мишей-самиць (Taconic Biosciences). В кожній групі для дослідження ефективності використовували всього 4 миші. Обробляння починали з перорального введення (через шлунковий зонд) досліджуваної сполуки або носія (20 % Captisol®, 25 мМ фосфату, pH 2,0 в 0,2 мл об'ємі) один раз або двічі на добу протягом 28 днів, коли розмір пухлини досягав приблизно 300 мг. З перебігом часу контролювали ріст пухлини та масу тіла для оцінювання ефективності та ознак токсичності. Узагальнені результати наведені в Таблиці 29. При дозі сполуки Прикладу 34, яка становила 100 мг/кг, за графіком дозування один раз на добу спостерігався регрес росту пухлини від -6,28 % до -30,96 %. При дозі сполуки Прикладу 35, яка становила 30 мг/кг, за графіком дозування двічі на добу спостерігався регрес росту пухлини від -67,68 % до -72,14 %. При дозі сполуки Прикладу 36, яка становила 30 мг/кг за графіком дозування двічі на добу був досягнутий рівень прогресування пухлини на рівні -68,96 %. Протягом усього дослідження цих сполук значної втрати маси тіла тварини не спостерігалось.

Таблиця 29

Активність протипухлинного росту у ксенотрансплантатній мишачій моделі H358 раку легенів

Обробляння	Доза (мг/кг)	Графік дозування	% регресу (День 12)	% регресу (День 26)
Приклад 35	30	PO, BID	-72,14	-67,68
Приклад 36	30	PO, BID	-68,96	NA
Приклад 34	100	PO, QD	-30,96	-6,28

Активність щодо протипухлинного росту в інших моделях раку легенів і моделях колоректального раку, раку підшлункової залози, раку сечового міхура та раку стравоходу

На додаток до ксенотрансплантатної моделі H358, сполуку Прикладу 35 випробували на інших ксенотрансплантатних моделях або одержаних від пацієнтів ксенотрансплантатів (PDX) раку легенів, колоректального раку, раку підшлункової залози, раку сечового міхура та раку стравоходу в різних дозах. Для ксенотрансплантатних моделей H1373, HCC44, MiaPaca-2, SW1463, KYSE-410 і UM-UC-3 зазвичай 5-10x10⁶ клітин у суміші матригелю 1:1 (загальний об'єм 0,2 мл) імплантували шляхом підшкірної ін'єкції в задню ногу "голих" мишей. Як правило, для дослідження ефективності в кожній групі використовували всього 4 миші. Обробляння починали з перорального введення (через шлунковий зонд) досліджуваної сполуки або носія (20 % Captisol®, 25 мМ фосфату, pH 2,0) в 0,2 об'ємі, коли розмір пухлини досягав приблизно 200-300 мг. Ріст пухлини та масу тіла контролювали з перебігом часу для оцінювання ефективності та ознак токсичності. Для моделі EL3187 PDX заморожені флакони, що містили фрагменти пухлини, розморожували при 37 °C на водяній бані. Фрагменти пухлини переносили у пробірку Falcon об'ємом 50 мл, в яку повільно додавали середовище DMEM при температурі танення льоду до загального об'єму 35 мл. Потім фрагменти пухлини центрифугували при 130хg протягом 2 хв при 4 °C, і супернатант відсмоктували. Цей етап промивання повторювали двічі, і фрагменти пухлини повторно суспендували в 10 мл DMEM для імплантації безтимусним "голим" мишам Foxnlnu (Envigo RMS, Inc., Mount Comfort, штат Індіана). Після того як об'єм пухлини досягав 800-1000 мм³, тварин умертвляли, і збирали пухлини із застосуванням асептичної техніки. Свіжі пухлини розрізали на фрагменти розміром від 10 мм³ до 15 мм³, і поміщали в охолоджувальне середовище Gibco HIBERNATE™. Фрагменти пухлини імплантували тваринам підшкірно із застосуванням троакарної голки 10 g. Коли розмір пухлини досягав 200-300 мм, тварин рандомізували для комплексного лікування.

Активність щодо протипухлинного росту або регресійна активність сполуки Прикладу 35 узагальнена в Таблиці 30. Серед моделей, наведених у Таблиці 31, EL3187 є ксенотрансплантатна модель, одержана від пацієнта (PDX), а всі інші є ксенотрансплантатні пухлинні моделі. Як показано в Таблиці 31, сполука Прикладу 35 демонструвала дозозалежну протипухлинну активність у всіх моделях, що свідчить про те, що сполука Прикладу 35 є активною проти раку з мутацією KRasG12C, включаючи рак легенів, колоректальний рак, рак підшлункової залози, рак сечового міхура та рак стравоходу.

Таблиця 30

Активність щодо протипухлинного росту сполуки Прикладу 35 в ксенотрансплантатних моделях або PDX моделях раку легенів, колоректального раку, раку підшлункової залози, раку сечового міхура та раку стравоходу

Ксенотрансплантатна/PDX модель (тип пухлини)	Інгібування пухлинного росту (%) або регресу (%) у разі сполуки Прикладу 35									
	1 м г/кг		3 м г/кг		5 м г/кг		10 м г/кг		30 м г/кг	
	QD ×28	BID ×28	QD ×28	BID ×28	QD ×28	BID ×28	QD ×28	BID ×28	QD ×28	BID ×28
H1373 (легені)					97,9	-26,3	-21,3	-49	-49,7	
HCC44 (легені)					28,3	57,5	32,7	61,8	77	84,1
EL3187 (легені)	52	89,2	-39,8	-91			-96	-96		
MiaPaca-2 (підшлункова залоза)					81,7	-36,1	-27	-45,2	-42	-43,6
SW1463 (колоректальний рак)					52,5	48,8	78,3	79,5	89,8	98,8
SW837 (колоректальний рак)					18,2	83,6	95,2	62,1	83,5	-23,8
KYSE-410 (рак стравоходу)							25,3	51,5	66,7	61,8
UM-UC-3 (рак сечовою міхура)					34,3	45,3	33,6	75	83,1	85

QD-один раз на добу; BID-двічі на добу;

Комбінована ефективність сполуки Прикладу 35 in vitro з іншими цільовими лікарськими засобами

- 5 На додаток до монотерапії, сполуку Прикладу 35 оцінювали з точки зору її комбінованої ефективності з іншими цільовими лікарськими засобами, такими як інгібітор CDK4 і CDK6 абемацикліб, дрібномолекулярні інгібітори EGFR ерлотиніб або афатиніб, моноклональне антитіло EGFR цетуксимаб і інгібітор ERK9 LY9614. Одинадцять клітинних ліній для цього дослідження одержані від ATCC, і вирощені в рекомендованих ATCC умовах. Усі лінії клітин
- 10 мають мутацію KRAS G12C, і це шість клітинних ліній раку легенів (H358, H1373, H1792, H2030, H2122, SW1573 і HCC44), дві лінії клітин колоректального раку (SW837 і SW1463), одна лінія клітин раку підшлункової залози (MiaPaca-2) і одна лінія клітин раку стравоходу (KYSE410). Аналіз проліферації виконували як 4-денний аналіз росту з використанням Cell TiterGlo® у ролі показника. Коротко кажучи, клітини висівали на 96-лункові планшети для клітинних культур, і залишали для прикріплення на ніч при 37 °C. Наступного дня клітини обробляли сполуками, або окремими обробленнями, або комбінованими обробленнями. Спочатку досліджувані сполуки серійно розводили у DMSO, потім розводили у середовищі у 5-кратній концентрації з 1 % DMSO і, нарешті, додавали до клітин у середовищі для розведення до 1x. Клітини додатково інкубували при 37 °C протягом 4 днів. Після збігання інкубаційного періоду змішували, і
- 20 додавали у лунки реагент Cell TiterGlo®. Через Юхв люмінесценцію зчитували приладом Perkin Elmer Envision. Із застосуванням 4-параметричної логістичної моделі для окремого та комбінованого оброблення визначали абсолютні значення IC₅₀ з подальшим визначенням комбінованих індексів для кожного комбінованого оброблення та клітинної лінії. Значення IC₅₀ комбінованих оброблень коригували на основі загальної концентрації кожної сполуки при сумісному додаванні. (Приклад: для співвідношення концентрації сполуки 1 і сполуки 2 1:1 комбінація IC₅₀ збільшується у 2 рази). Комбінований індекс (CI) визначає ступінь, до якого ефективність комбінованої терапії відрізняється від очікуваної адитивної ефективності, і ґрунтується на визначенні адитивності Loewe.

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

30

де $C_{A,y}$ і $C_{B,y}$ - концентрації препаратів А та В, які спричиняють ефект, у, при комбінованому застосуванні;
 $IC_{A,y}$ і $IC_{B,y}$ - концентрації А та В, які спричиняють ефект, у, при їх окремому введенні.

- 5 У деяких випадках, якщо для розрахунку CI використовували оцінене значення IC_{50} , розрахований CI називається індексом потенціювання. Біологічна інтерпретація комбінованого індексу або індексу потенціювання така: синергетична, якщо комбінований індекс або індекс потенціювання $<0,5$, адитивна, якщо комбінований індекс або індекс потенціювання становить від 0,5 до 2, і антагоністична, якщо комбінований індекс або індекс потенціювання >2 .
- 10 Як показано в Таблиці 31, комбінація сполуки Прикладу 35 і абемациклібу мала адитивну або синергетичну ефективність щодо інгібування пухлинних клітин з мутацією KRasG12C. Серед одинадцяти досліджених клітинних ліній адитивні ефекти спостерігалися у п'яти клітинних лініях з комбінованим індексом (CI) між 0,5 та 1,2, а синергетичний ефект спостерігався у шести клітинних лініях із CI $<0,5$, що свідчило про те, що комбінація сполуки
- 15 Прикладу 35 і абемациклібу може принести користь хворим на рак з мутацією KRas G12C.

Таблиця 31

Комбінація in vitro сполуки Прикладу 35 та інгібітора CDK4/CDK6 абемациклібу

Назва клітинної лінії	Сполука	IC_{50} (мкМ) сполуки	IC_{50} (мкМ) сполуки Прикладу 35	Комбінована IC_{50} (мкМ)	Комбінований індекс або індекс потенціювання
SW1463	Абемацикліб	0,16253	0,001089422	0,001861309	0,859990152
SW837	Абемацикліб	3,2175	0,413147553	0,276563347	0,377680849
H358	Абемацикліб	0,47697	0,003199233	0,006847357	1,077334012
HCC44	Абемацикліб	3,64845	1,764025208	2,86634865	1,205263179
NCI-H1373	Абемацикліб	4,27817	0,403993227	0,11698021	0,158451664
NCI-H1792	Абемацикліб	0,40097	0,118134759	0,041106255	0,225239313
NCI-H2030	Абемацикліб	1,81728	0,819557983	0,357361105	0,316343687
NCI-H2122	Абемацикліб	0,32737	0,031200861	0,02784263	0,488708133
SW1573	Абемацикліб	0,35607	10,7632	0,614058717	0,890789114
KYSE-410	Абемацикліб	1,94423	4,89618484	0,773507455	0,277914318
MIAPACA2	Абемацикліб	0,28033	0,00748134	0,01060427	0,727628496

- Як показано в Таблиці 32, комбінація сполуки Прикладу 35 та дрібномолекулярного інгібітора EGFR ерлотинібу або афатинібу має адитивний або синергетичний ефект щодо
- 20 інгібування пухлинних клітин, які містили мутацію KRasG12C. Для комбінації ерлотинібу, з-посеред одинадцяти досліджених клітинних ліній, адитивний ефект спостерігався у п'яти клітинних лініях з комбінованим індексом або індексом потенціювання від 0,5 до 1,15, а синергетичний ефект спостерігався у шести клітинних лініях з комбінованим індексом або індексом потенціювання $<0,5$. Для комбінації афатинібу, з-посеред дев'яти досліджених
- 25 клітинних ліній адитивний ефект спостерігався в чотирьох клітинних лініях з CI від 0,5 до 1,1, а синергетичний ефект спостерігався у п'яти клітинних лініях з CI $<0,5$. Ці дані свідчили про те, що комбінація сполуки Прикладу 35 та дрібномолекулярного інгібітора EGFR може принести користь хворим на рак з мутацією KRas G12C.

Таблиця 32

Комбінація in vitro сполуки Прикладу 35 та дрібномолекулярного інгібітора EGFR ерлотинібу або афатинібу

Назва клітинної лінії	Сполука	IC ₅₀ (мкМ) сполуки	IC ₅₀ (мкМ) сполуки Прикладу 35	Комбінована IC ₅₀ (мкМ)	Комбінований індекс або індекс потенціювання
SW1463	Ерлотиніб	0,40193	0,001089	0,002231	1,026498376
SW837	Ерлотиніб	>10	0,413148	0,140876	0,170491111
H358	Ерлотиніб	2,19247	0,003199	0,007357	1,151488525
HCC44	Ерлотиніб	>10	1,764025	1,567802	0,444381951
NCI-H1373	Ерлотиніб	>10	0,403993	0,411429	0,509203323
NCI-H1792	Ерлотиніб	>10	0,118135	0,090106	0,381370715
NCI-H2030	Ерлотиніб	>10	0,819558	0,424816	0,259174125
NCI-H2122	Ерлотиніб	12,1511	0,031201	0,030705	0,493309984
SW1573	Ерлотиніб	>10	10,7632	11,32891	0,526279729
KYSE-410	Ерлотиніб	>10	4,896185	1,153993	0,11784619
MIAPACA2	Ерлотиніб	>10	0,007481	0,015373	1,027399401
SW1463	Афатиніб	0,05612	0,003248	0,003838	0,625028705
SW837	Афатиніб	1,28333	0,321329	0,06905	0,134347371
H358	Афатиніб	0,30551	0,002231	0,004945	1,11655131
NCI-H1373	Афатиніб	2,21668	0,255708	0,090101	0,196502052
NCI-H1792	Афатиніб	3,39177	0,903764	0,2928	0,205152445
NCI-H2122	Афатиніб	1,45096	0,03372	0,019501	0,295874375
SW1573	Афатиніб	1,58254	12,736	2,456936	0,872720042
KYSE-410	Афатиніб	0,65031	4,058337	0,041564	0,03707842
MIAPACA2	Афатиніб	1,94391	0,005951	0,011389	0,959906159

Як показано в Таблиці 33, комбінація сполуки Прикладу 35 і антитіла проти EGFR цетуксимабу мала адитивну або синергетичну ефективність щодо інгібування пухлинних клітин з мутацією KRas G12C. З-посеред одинадцяти досліджених клітинних ліній п'ять клітинних ліній мали адитивний ефект з індексом потенціювання (CI) від 0,5 до 1,06, а шість клітинних ліній мали синергетичний ефект з індексом потенціювання <0,5, що свідчило про те, що комбінація сполуки Прикладу 35 і цетуксимабу може принести користь хворим на рак з мутацією KRasG12C.

Таблиця 33

Комбінація in vitro сполуки Прикладу 35 та антитіла проти EGFR цетуксимабу

Назва клітинної лінії	Сполука	IC ₅₀ (мкМ) сполуки	IC ₅₀ (мкМ) сполуки Прикладу 35	Комбінована IC ₅₀ (мкМ)	Індекс потенціювання
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

- 5 Як показано в Таблиці 34, комбінація сполуки Прикладу 35 і інгібітора ERK LY3219446 мав адитивну або синергетичну ефективність щодо інгібування пухлинних клітин з мутацією KRas G12C. 3-посеред десяти досліджених клітинних ліній адитивний ефект спостерігався у 5 клітинних ліній з CI від 0,5 до 1,2, а синергетичний ефект, який спостерігався у 5 клітинних ліній, які мали синергетичний ефект з комбінованим індексом або індексом потенціювання <0,5, свідчив про те, що комбінація сполуки Прикладу 35 та інгібітора ERK може принести користь хворим на рак з мутацією KRasG12C.

Таблиця 34

Комбінація in vitro сполуки Прикладу 35 та інгібітора ERK LY3214996

Назва клітинної лінії	Сполука	IC ₅₀ (мкМ) сполуки	IC ₅₀ (мкМ) сполуки Прикладу 35	Комбінована IC ₅₀ (мкМ)	Комбінований індекс або індекс потенціювання
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
NC1-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

- 10 Комбінована ефективність сполуки Прикладу 35 з хіміотерапевтичними препаратами in vitro
- 15 Сполуку Прикладу 35 також комбінували з хіміотерапевтичними препаратами, включаючи пеметрексед, карбоплатин або цисплатин, у трьох лініях клітин раку легенів, H1792, H358 та H2122, in vitro. Як показано в Таблиці 35, для комбінації пеметрекседу, виходячи з CI, спостерігалися адитивні або синергетичні ефекти. Подібні комбінаційні ефекти спостерігалися при комбінації карбоплатину та цисплатину.

Таблиця 35

Комбінація in vitro сполуки Прикладу 35 та хіміотерапевтичних препаратів (комбінований індекс)

Клітинні лінії	NCI-H1792	NCI-H358	NCI-H2122
ABS_IC50_Сполука Прикладу 35 (мкМ)	0,8399	0,001	0,209
AB8_IC50_пеметрексед (мкМ)	20	20	0,003739
AB8_IC50_Комбінація (мкМ)	1,305	0,001	0,000084
Комбінований індекс	0,809	0,5	0,011
ABS_IC50_карбоплатин (мкМ)	20	20	20
ABS_IC50_Комбінація (мкМ)	2,6	0,001	0,0363
Комбінований індекс	1,616	0,5	0,087
AB8_IC50_цисплатин (мкМ)	0,312	0,773	1,163
ABS_IC50_Комбінація (мкМ)	0,134	0,001	0,15
Комбінований індекс	0,296	0,5	0,422

- 20 Комбінована ефективність сполуки Прикладу 35 in vivo з іншими цільовими лікарськими засобами
- Сполуку Прикладу 35 оцінювали у комбінації з інгібітором CDK4/CDK6 абемациклібом, дрібномолекулярними інгібіторами EGFR ерлотинібом або афатинібом, моноклональним антитілом проти EGFR цетуксимабом або інгібітором ERK LY3214996 на моделі PDX на тваринах. Всього використовували шість ксенотрансплантатних моделей або моделей PDX in vivo - чотири легеневі моделі (H358, H1373, LU99 і EL3187 PDX), одна колоректальна модель

(SW1463) і одна модель підшлункової залози (MiaPaca-2). Таблиця 36 є підсумком усіх цих результатів комбінованого дослідження *in vivo*.

Комбінацію сполуки Прикладу 35 та інгібітора CDK4/6 абемациклібу досліджували у всіх шести моделях. У всіх шести моделях згадана комбінація була кращою, аніж окремо для сполуки Прикладу 35 або абемациклібу. У чотирьох моделях раку легенів та в одній моделі раку підшлункової залози для згаданої комбінації спостерігалася синергія та значний регрес росту пухлини. У колоректальній моделі SW1463 спостерігалася краща протипухлинна активність, ніж окремо для сполуки Прикладу 35 або абемациклібу.

Дослідження комбінації сполуки Прикладу 35 та дрібномолекулярного інгібітора EGFR ерлотинібу проводили у всіх шести моделях. У всіх шести моделях комбінація є кращою, ніж окремо для сполуки Прикладу 35 або для ерлотинібу. У трьох моделях раку легенів і в одній моделі раку підшлункової залози для згаданої комбінації спостерігалася синергія та значний регрес росту пухлини. У моделі колоректального раку SW1463 та моделі раку легенів LU99 комбінація є кращою, ніж окремо для сполуки Прикладу 35 або для ерлотинібу. У ксенотрансплантатній моделі раку легенів H358 спостерігалися адитивний ефект і краща протипухлинна активність при комбінації сполуки Прикладу 3 та дрібномолекулярного інгібітора EGFR афатинібу у порівнянні з будь-якою зі сполук окремо.

Комбінаційні дослідження *in vivo* сполуки Прикладу 35 та антитіла проти EGFR цетуксимабу проводили на ксенотрансплантатній моделі раку легенів H358 і ксенотрансплантатній моделі колоректального раку SW1463. В обох моделях для згаданої комбінації спостерігалися регрес росту пухлини та краща комбінаційна ефективність. Комбінація є кращою, ніж окремо сполука Прикладу 35 або цетуксимаб.

Комбінацію сполуки Прикладу 35 та інгібітора ERK (ERKi) LY3214996 досліджували у всіх шести моделях. У всіх шести моделях для згаданої комбінації спостерігається синергетичний або адитивний ефект, і комбінація є кращою, ніж окремо сполука Прикладу 35 або інгібітор ERK. У трьох моделях раку легенів (H358, H1373 і EL3187), одній моделі раку підшлункової залози та одній колоректальній моделі спостерігався значний регрес росту пухлини.

Таблиця 36

Протипухлинна активність сполуки Прикладу 35 *in vivo* в поєднанні з іншими цільовими лікарськими засобами в ксенотрансплантатних пухлинних моделях або моделях PDX

Лікування	Доза (мг/кг)	Доза	Пригнічення росту (%) і регресу (%) пухлин в ксенотрансплантатних пухлинних моделях або моделях PDX							
			H358 (Легені)		H1373 (Легені)	EL3187 (Легені PDX)	Mia Paca-2 (Підшлункова залоза)	SW1463 (Колоректальний рак)		LU99 (Легені)
Сполука Прикладу 35	3	QD×28	-	-	-	85,2	-	-	-	-
	10	QD×28	74,9	46,6	98,5		-27	44	68,7	
	30	QD×28	-	-	-	-	-	-	-	76,2
ERKi	100	QD×28	71,1	-	85,2	85,4	46,5	-	92,7	28,6
Абемацикліб	50	QD×28	77	-	77,6	41,3	45,1	53	-	(-21,5)*
Ерлотиніб	25	QD×28	76,9	-	50,6	29,5	(-77,7)*	40,9		(-23,1)*
Цетуксимаб	20	QD×28	-	87	-	-	-	97,9	94,7	-
Афатиніб	25	QD×28	-	77,4	-	-	-	-	-	-
Сполука Прикладу 35+ERKi	10+100	-	-22,1		-70,2	-83,3	-65,4		-24,8	-3,7
Сполука Прикладу 35+ абемацикліб	10+50	-	-61,8		-54,4	-96	-59,8	81		-37,4
Сполука Прикладу 35+ ерлотиніб	10+25	-	-64		-48,9	-89,9	-62,2	88		98,9
Сполука Прикладу 35+ цетуксимаб	30+20	-		-34,6				-20,2	-42,8	-

Таблиця 36

Протипухлинна активність сполуки Прикладу 35 in vivo в поєднанні з іншими цільовими лікарськими засобами в ксенотрансплантатних пухлинних моделях або моделях PDX

Лікування	Доза (мг/кг)	Доза	Пригнічення росту (%) і регресу (%) пухлин в ксенотрансплантатних пухлинних моделях або моделях PDX							
			H358 (Легені)		H1373 (Легені)	EL3187 (Легені PDX)	Mia Раса-2 (Підшлункова залоза)	SW1463 (Колоректальний рак)		LU99 (Легені)
Сполука Прикладу 35+ афатиніб	10+25	-		91,3						-

* Вказує, що середній об'єм пухлини був більшим, ніж у контрольній групі, яка одержувала носій

Комбінована ефективність з імунотерапевтичними препаратами, антитілами проти PD-1 або антитілами проти PD-L1

Для оцінювання ефектів інгібування KRas G12C та комбінації імунотерапевтичних препаратів використовували мишачу сингенну модель. У цій моделі мутацію KRas G12D перетворювали на мутацію KRas G12C шляхом введення CRISPR в лінію клітин CT-26 лінію клітин колоректальної пухлини мишей. Введення KRas G12C підтверджувалося визначенням генетичних та функціональних характеристик. Сконструйована лінія клітин має назву CT-26-H4/KRas G12C. Ці клітини імплантували мишам Balb/c, і лікування сполукою починали через 6 днів після імплантування пухлинних клітин. У цьому дослідженні сполуку Прикладу 35 поєднували або з антитілом проти PD-L1 (RMP1 (BioXcell, номер за каталогом BE0146)), або з антитілом проти PD-1 (Holmgaard RB, et al., J. Immunotherapy Cancer 2018; 6(47): 1-15), зі схемою дозування, наведеною в Таблиці 37. Як показано в Таблиці 37, сполука Прикладу 35 демонструвала значну самостійну активність із середнім рівнем інгібування росту пухлини 89,4 % і без повної відповіді при дозі 30 мг/кг наприкінці 3-тижневого періоду введення дози. Антимішаче антитіло 178G7 проти PD-L1 демонструвало пригнічення росту пухлини на рівні 36,1 % без повної відповіді, а анти-PD-1 антитіло RMP1 демонструвало 70,7 % пригнічення росту пухлини і 10 % (1 з 10) повну відповідь в кінці періоду введення дози (21 день) або на 59 день. Однак комбінація сполуки Прикладу 35 з антитілом проти PD-L1 або антитілом проти PD-1 забезпечувала досягнення значно кращої протипухлинної активності. Наприкінці 3-тижневого періоду введення дози комбінація сполуки Прикладу 35 з антитілом проти PD-L1 або антитілом проти PD-1 показала -33,9 % і -19,4 % регресу пухлини і 30 % та 40 % повну відповідь, відповідно. Через 3 тижні лікування сполукою і препаратами припинили, і всі пухлини в групах монотерапії, за винятком 1 тварини в групі анти-PD-1, почали відновлювати ріст. Однак багато пухлин у двох комбінованих групах не мали ознак повторного росту. Через 38 днів після останньої дози (день 59) комбіновані групи мали 40 % та 60 % повну відповідь, що вказувало на те, що багато пухлин у комбінованих групах були ліквідовані. Ці результати свідчили про те, що лікування сполукою Прикладу 35 у поєднанні з антитілом проти PD-L1 або антитілом проти PD-1 може бути корисним для хворих на рак з мутацією KRas G12C.

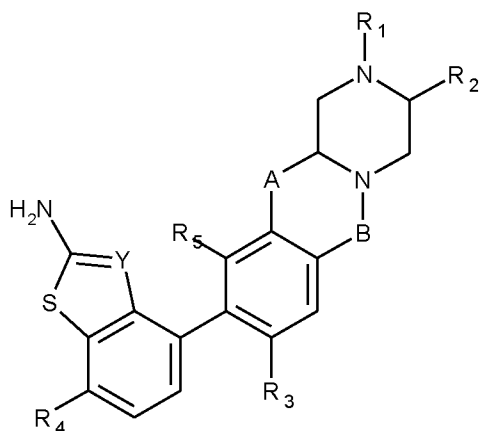
Таблиця 37

Протипухлинна активність in vivo сполуки Прикладу 35 у поєднанні з імунотерапевтичними препаратами (антитіло проти PD-1 або антитіло проти PD-L1) у сингенній моделі СТ-26-H4/KRasG12C

Лікування	Доза	Частота введення дози	TGI (T/C) (%)	% регресу	Повний регрес (день 21)	Повний регрес (день 59)
Носій		PO, QD×21	-	-	0/10	0/10
Сполука Прикладу 35	30 мг/кг	PO, QD×21	89,4(11,6)	-	0/10	0/10
Антитіло проти PD-L1 (178G7)	500 мкг/миша	IP, Q7D×3	36,1 (63,9)	-	0/10	0/10
Антитіло проти PD-1 (RMP1-14)	250 мкг/миша	IP, BIW×3	-70,7 (29,3)	-	1/10	1/10
Сполука	30 мг/кг	PO, QD×21	-	-33,9	3/10	4/10
Прикладу 35+ Антитіло проти PD-L1 (178G7)	500 мкг/миша	IP, Q7D×3				
Сполука	30 мг/кг	PO, QD×21	-	-19,4	4/10	6/10
Прикладу 35+ Антитіло проти PD-1 (RMP1-14)	250 мкг/миша	IP, BIW×3				

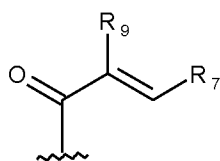
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5 1. Сполука формули:



де:

- 10 А являє собою -OCH₂-, -N(R₆)CH₂-, -OCH₂CH₂-, -N(R₆)CH₂CH₂-, -CH₂OCH₂- або -CH₂N(R₆)CH₂-;
В являє собою -CH₂- або -C(O)-;
Y являє собою -C(CN)- або -N-;
R₁ являє собою -CN, -C(O)C≡CR₈ або групу формули



15 ;

R₂ являє собою H, метил або -CH₂CN;
кожен з R₃ та R₅ незалежно являє собою H, галоген, -C₀₋₃-алкілциклопропіл, -C₁₋₆-алкіл,

факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} , або -O- C_{1-6} -алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} ;

R_4 являє собою H, галоген або - C_{1-6} -алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} ;

R_6 являє собою H або - C_{1-6} -алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} ;

5 R_7 являє собою H, галоген, - $NR_{11}R_{12}$, - $CH_2NR_{11}R_{12}$, - C_{1-6} -алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} або R_{13} , - C_{0-3} -алкілциклопропіл або -O- C_{1-6} -алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} або R_{13} ;

R_8 являє собою H, - C_{1-4} -алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} , або - C_{3-6} -циклоалкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} ;

10 R_9 являє собою H, галоген, -CN, - C_{0-3} -алкіл- C_{3-6} -циклоалкіл або - C_{1-6} -алкіл, факультативно заміщений 1-3 рази замісником R_{10} ;

R_{10} у кожному разі незалежно являє собою галоген, кисень, гідроксигрупу, - C_{1-4} -алкіл або -O- C_{1-4} -алкіл;

кожен з R_{11} та R_{12} незалежно являє собою H, - C_{1-4} -алкіл або - C_{1-4} -гетероалкіл, де R_{11} та R_{12} можуть об'єднуватись для одержання гетероциклоалкілу; та

R_{13} у кожному разі незалежно являє собою -N- C_{1-4} -алкіл, або її фармацевтично прийнятна сіль.

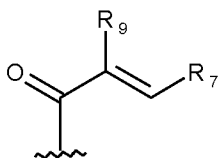
2. Сполука за п. 1, де А являє собою -OCH₂CH₂-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

3. Сполука за п. 1 або 2, де В являє собою -C(O)-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

4. Сполука за будь-яким з пп. 1-3, де Y являє собою -C(CN)-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

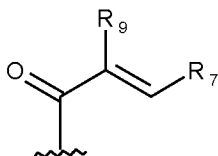
5. Сполука за будь-яким з пп. 1-3, де Y являє собою -N-, або її фармацевтично прийнятна сіль.

6. Сполука за будь-яким з пп. 1-5, де R_1 являє собою групу формули



і де R_7 являє собою H, F, Cl, метил, етоксигрупу, етил, ізопропіл або циклопропіл, або її фармацевтично прийнятна сіль.

7. Сполука за будь-яким з пп. 1-5, де R_1 являє собою групу формули



і де R_9 являє собою H, F, Cl, -CHF₂, -CF₃ або -CH₂OH, або її фармацевтично прийнятна сіль.

8. Сполука за будь-яким з пп. 1-5, де R_1 являє собою -CN, -C(O)C≡CR₈, або її фармацевтично прийнятна сіль.

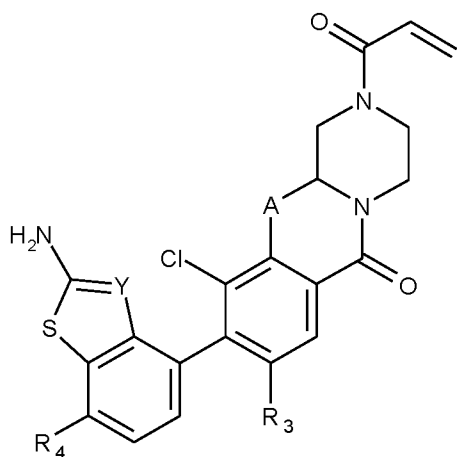
9. Сполука за будь-яким з пп. 1-8, де R_2 являє собою H або метил, або її фармацевтично прийнятна сіль.

10. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, де R_3 являє собою H, F, Cl, метил, метоксигрупу, етил, ізопропіл або циклопропіл, або її фармацевтично прийнятна сіль.

11. Сполука за будь-яким з пп. 1-10, де R_4 являє собою H, F або Cl, або її фармацевтично прийнятна сіль.

12. Сполука за будь-яким з пп. 1-11, де R_5 являє собою H, -CHF₂, -CH₂F, -CH₂OH або -CH₂OCH₃, або її фармацевтично прийнятна сіль.

13. Сполука за п. 1 формули:



де:

А являє собою $-\text{OCH}_2-$ або $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$;

5 У являє собою $-\text{C}(\text{CN})-$ або $-\text{N}-$;

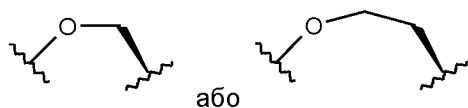
R_3 являє собою Cl або F;

R_4 являє собою H або F, у разі, якщо У являє собою $\text{C}(\text{CN})$; і

R_4 являє собою F, у разі, якщо У являє собою N, або її фармацевтично прийнятна сіль.

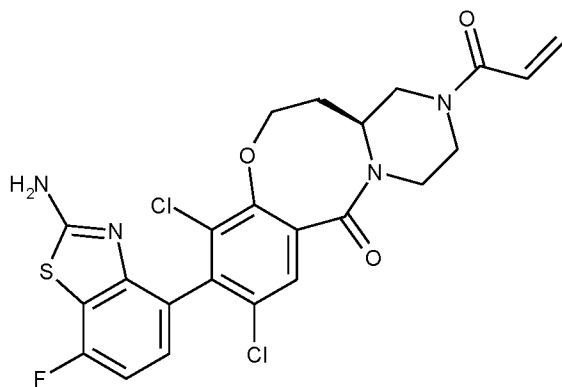
14. Сполука за п. 13, де А являє собою

10

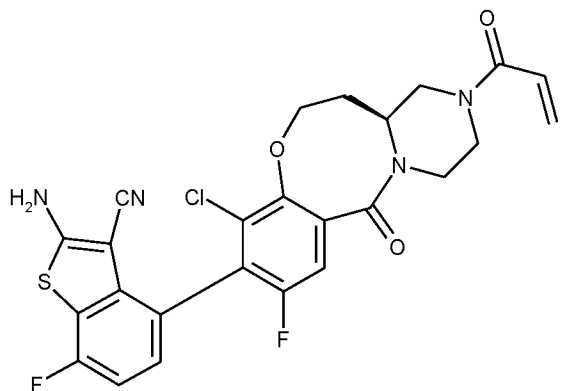
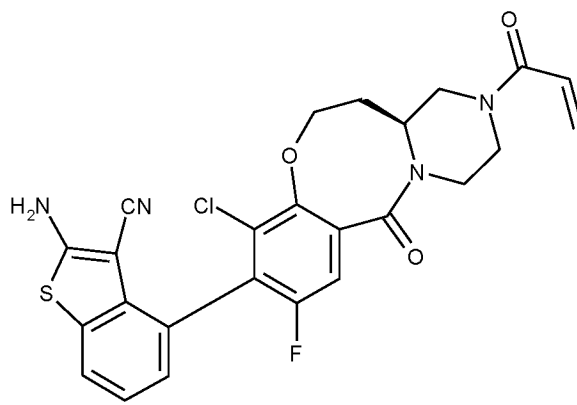


або

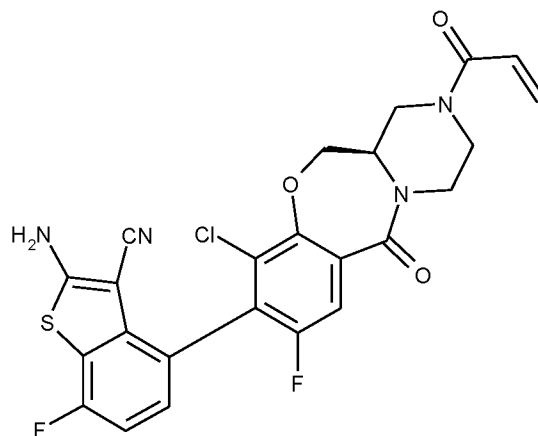
15. Сполука за п. 1, вибрана з:



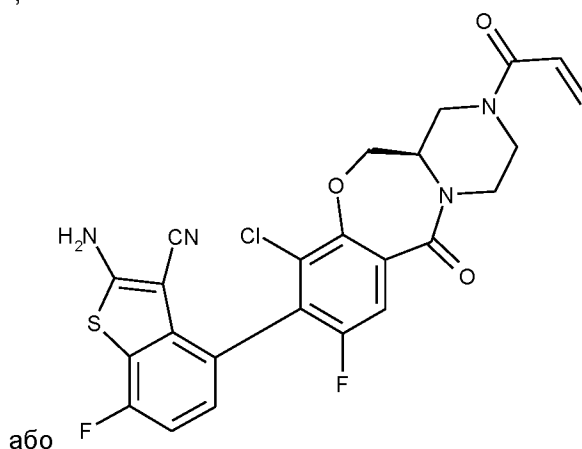
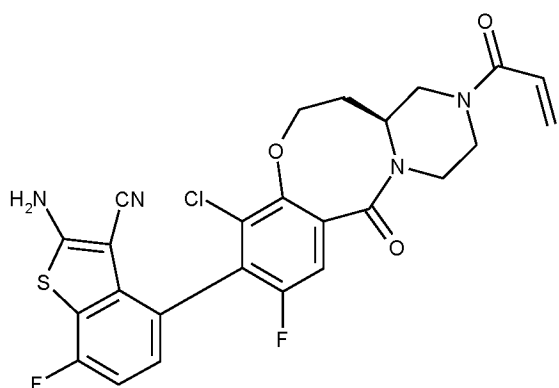
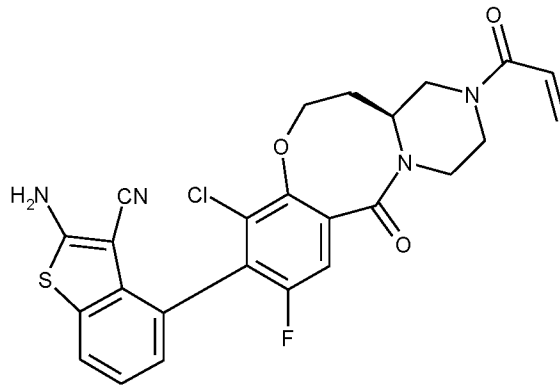
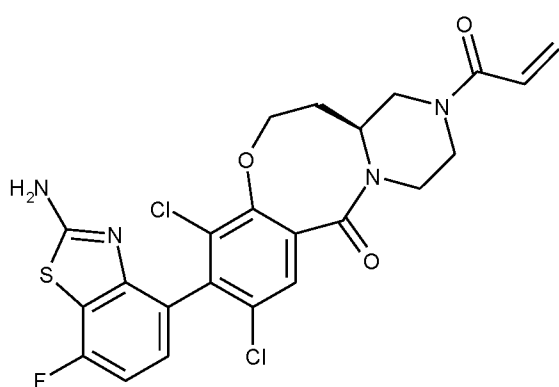
15



або



або її фармацевтично прийнята сіль.
16. Сполука за п. 15, яка являє собою:



5

або

17. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким з пп. 1-16 або її фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

10 18. Фармацевтична композиція за п. 17 для використання при лікуванні пацієнта з раком, який вибрано з групи, яку складають рак легенів, рак підшлункової залози, рак шийки матки, рак стравоходу, рак ендометрія, рак яєчників, холангіокарцинома або колоректальний рак.

15 19. Сполука або її фармацевтично прийнята сіль за будь-яким з пп. 1-16 для використання при лікуванні пацієнта з раком, який вибрано з групи, яку складають рак легенів, рак підшлункової залози, рак шийки матки, рак стравоходу, рак ендометрія, рак яєчників, холангіокарцинома або колоректальний рак.

20 20. Сполука або її фармацевтично прийнята сіль за п. 19, причому рак являє собою недрібноклітинний рак легенів, і при цьому одна або декілька клітин експресують мутантний білок KRas G12C.

25 21. Сполука або її фармацевтично прийнята сіль за п. 19, причому рак являє собою колоректальний рак, і при цьому одна або декілька клітин експресують мутантний білок KRas G12C.

22. Сполука або її фармацевтично прийнята сіль за п. 19, причому рак являє собою рак підшлункової залози, і при цьому одна або декілька клітин експресують мутантний білок KRas G12C.

23. Сполука або її фармацевтично прийнята сіль за п. 19, причому пацієнт має рак, який, як було визначено, мав одну або декілька клітин, які експресують мутантний білок KRas G12C перед введенням сполуки або її фармацевтично прийнятної солі.

30 24. Сполука або її фармацевтично прийнята сіль за будь-яким з пп. 1-16 для застосування при лікуванні пацієнта з раком, який має мутацію KRAS G12C.

25. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким з пп. 1-16 для застосування в терапії.

26. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким з пп. 1-16 для застосування в лікуванні раку.

35 27. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким з пп. 1-16 для застосування при

виготовленні лікарського засобу для лікування раку.

28. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за п. 26 або 27, при цьому рак вибрано з групи, яку складають рак легенів, рак підшлункової залози, рак шийки матки, рак стравоходу, рак ендометрія, рак яєчників, холангіокарцинома та колоректальний рак.

5 29. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким з пп. 1-16 для застосування в комбінації - одночасно, окремо або послідовно - з одним або декількома з: інгібітора PD-1 або PD-L1, інгібітора CD4/CDK6 або його фармацевтично прийнятної солі, інгібітора EGFR або його фармацевтично прийнятної солі, інгібітора ERK або його фармацевтично прийнятної солі, препарату платини та пеметрекседу або його фармацевтично прийнятної солі, в лікуванні раку.

10 30. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за п. 28, де рак є раком легенів.