

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201590931 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.01.29

(51) Int. Cl. C07D 239/95 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.11.15

(54) ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2-АМИНО-ХИНАЗОЛИНА
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) 12192970.7

(32) 2012.11.16

(33) EP

(86) PCT/EP2013/073901

(87) WO 2014/076221 2014.05.22

(71) Заявитель:
ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
ЮСи (IE)

(57) Настоящее изобретение относится к гетероциклическим замещенным производным 2-амино-хиназолина, способам их получения, фармацевтическим композициям и их применению при лечении вирусных инфекций.

(72) Изобретатель:
Ласт Стефан Жюльен, Мак Гоуен
Дэвид Крейг, Эмбрехтс Вернер (BE),
Питерс Серж Мария Алоисиус
(NL), Йонкерс Тим Хьюго Мария,
Рабуассон Пьер Жан-Мари Бернар
(BE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

201590931

A1

A1

201590931

ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2-АМИНО-ХИНАЗОЛИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Настоящее изобретение относится к гетероциклическим замещенным производным 2-амино-хиназолина, способам их получения, фармацевтическим композициям и их применению при лечении вирусных инфекций.

Настоящее изобретение относится к применению гетероциклических замещенных производных 2-амино-хиназолина при лечении вирусных инфекций, иммунных или воспалительных нарушений, в которые вовлечены модуляция или агонизм толл-подобных рецепторов (TLR). Толл-подобные рецепторы представляют собой основные трансмембранные белки, характеризующиеся внеклеточным лейцин-богатым доменом и цитоплазматическим расширением, которое содержит консервативную область. Врожденная иммунная система может распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны посредством данных TLR, экспрессируемых на клеточной поверхности определенных типов иммунных клеток. При распознавании чужеродных патогенов активируется выработка цитокинов и повышается экспрессия ко-стимулирующих молекул на фагоцитах. Это приводит к модуляции поведения Т-клеток.

Установлено, что большинство видов млекопитающих имеют от десяти до пятнадцати типов толл-подобных рецепторов. В общей сложности у людей и мышей выявили тринадцать TLR (под названием TLR1-TLR13), а у других видов млекопитающих обнаружили эквивалентные формы многих из них. Тем не менее, эквиваленты определенных TLR, обнаруженных у людей, не присутствуют у всех млекопитающих. Например, ген, кодирующий белок, аналогичный TLR10 у людей, присутствует у мышей, но, оказывается, в определенный момент в прошлом был поврежден ретровирусом. С другой стороны, у мышей экспрессируются TLR 11, 12 и 13, ни один из которых не представлен у человека. У других млекопитающих могут экспрессироваться TLR, которые не обнаружены у человека. Другие виды, не являющиеся млекопитающими, могут иметь TLR, отличные от таковых у

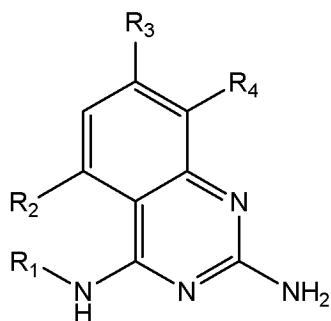
млекопитающих, доказательством этому служит TLR14, обнаруженный у рыбы фугу рода Takifugu. Это может осложнить процедуру использования экспериментальных животных в качестве моделей врожденного иммунитета человека.

Для обзора TLR смотри следующие публикации в журналах. Hoffmann, J.A., Nature, 426, p33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T., Annual Rev. Immunology, 21, p335-376, 2003; Ulevitch, R. J., Nature Reviews: Immunology, 4, p512-520, 2004.

Ранее были описаны соединения, проявляющие активность в отношении толл-подобных рецепторов, такие как производные пурина в WO 2006/117670, производные аденина в WO 98/01448 и WO 99/28321 и пиримидины в WO 2009/067081.

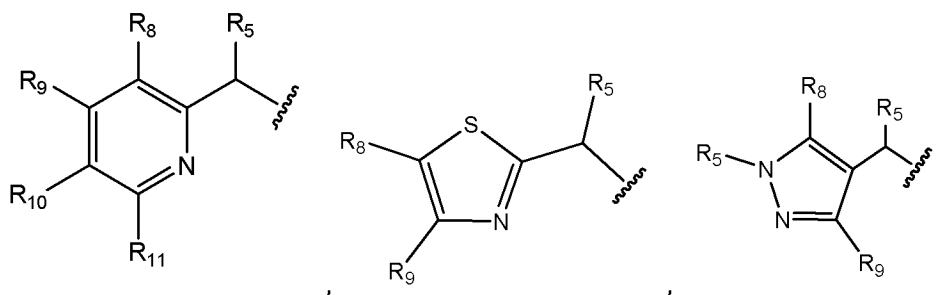
Тем не менее, существует острая потребность в новых модуляторах толл-подобных рецепторов, обладающих предпочтительной селективностью, более высокой эффективностью, более высокой метаболической стабильностью, а также улучшенным профилем безопасности по сравнению с соединениями из известного уровня техники.

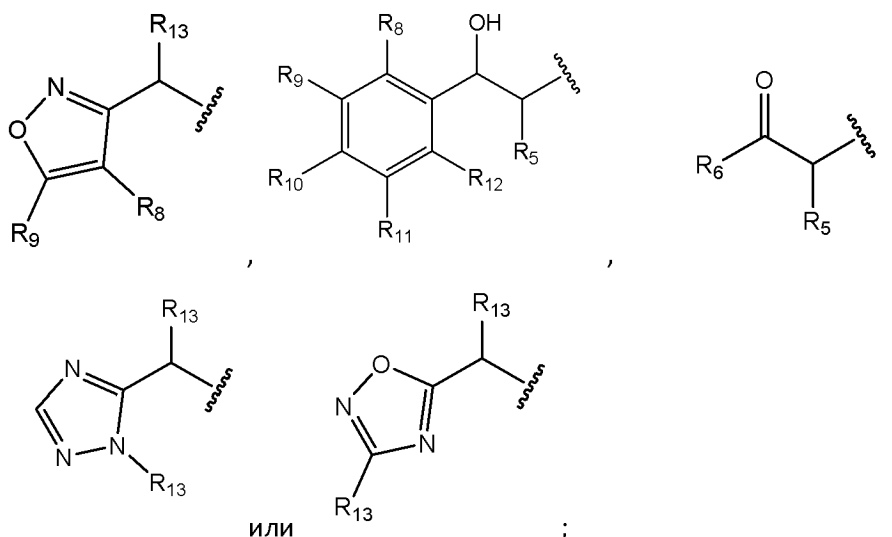
В соответствии с настоящим изобретением представлено соединение формулы (I),



или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф, где

R₁ представляет собой любую из следующих структур:





R_2 представляет собой водород, $-O-(C_{1-3})$ -алкил, галоген, (C_{1-3}) -алкил, $-O-(C_{1-3})$ -алкил- $O-(C_{1-3})$ -алкил или CH_2OH ;

R_3 представляет собой водород, $-O-(C_{1-3})$ -алкил, галоген, (C_{1-3}) -алкил или $-C(=O)-R_7$, где R_7 представляет собой $-O-(C_{1-3})$ -алкил, NH_2 , $NH(CH_3)$, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(C_{1-3})$ -алкил, $N((C_{1-3})$ -алкил) $_2$ или пирролидин;

R_4 представляет собой водород или фтор;

R_5 представляет собой (C_{1-3}) -алкил, (C_{1-3}) -фтор-алкил или CH_2OH ;

R_6 представляет собой NH_2 , $NH(CH_3)$ или $N(CH_3)_2$, (гетеро)-анилины, необязательно замещенные одним или несколькими R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} или R_{12} , или (гетеро)-бензиламины, необязательно замещенные одним или несколькими R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} или R_{12} ,

каждый из R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} и R_{12} , которые являются одинаковыми или различными, независимо выбран из водорода, (C_{1-3}) -алкила, $-O-(C_{1-3})$ -алкила или галогена,

и

R_{13} представляет собой водород, (C_{1-3}) -алкил или (C_{1-3}) -фтор-алкил.

Предпочтительными соединениями согласно настоящему изобретению являются соединения с номерами 12 и 29, которые изображены в таблице II.

Соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморфы обладают активностью в качестве фармацевтических препаратов, в

частности, в качестве модуляторов толл-подобных рецепторов (в особенности, активности TLR7 и/или TLR8).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер, стереоизомерную форму, сольват или полиморф вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Кроме того, соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф в соответствии с настоящим изобретением, или фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф, можно применять в качестве лекарственного препарата.

Другим аспектом настоящего изобретения является то, что соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, его сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф, или указанную фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф, можно соответственно применять при лечении нарушения, в которое вовлечена модуляция TLR7 и/или TLR8.

Термин "(C₁₋₃)-алкил" относится к насыщенному алифатическому углеводороду с неразветвленной цепью, разветвленной цепью или циклическому насыщенному алифатическому углеводороду, содержащему определенное количество атомов углерода.

Термин "(C₁₋₃)-фтор-алкил" относится к насыщенному алифатическому углеводороду с неразветвленной цепью, разветвленной цепью или циклическому насыщенному алифатическому углеводороду, содержащему определенное количество атомов углерода, где один или несколько атомов водорода были замещены атомом фтора.

Термин "галоген" относится ко фтору, хлору, бром или йоду, предпочтительно ко фтору и хлору.

Термин "анилин" обозначает соединение формулы $C_6H_5NR_{13}-$, состоящее из фенильной группы, прикрепленной к аминогруппе; при этом "(гетеро)-анилин" означает, что в ароматическом кольце присутствуют 1-3 атома азота, предпочтительно 1 атом азота.

Термин "бензиламин" означает соединение формулы $C_6H_5CH_2NR_{13}-$, состоящее из бензильной группы, $C_6H_5CH_2$, прикрепленной к функциональной аминогруппе; при этом "(гетеро)-бензиламин" означает, что в ароматическом кольце присутствуют 1-3 атома азота, предпочтительно 1 атом азота.

Как применяется в данном документе, любая химическая формула со связями, показанными только в виде сплошных линий, а не в виде сплошных клиновидных или пунктирных клиновидных связей или иным образом показанная как имеющая конкретную конфигурацию (например, *R*, *S*) вокруг одного или нескольких атомов, подразумевает каждый возможный стереоизомер или смесь двух или более стереоизомеров.

Термины "стереоизомеры", "стереоизомерные формы" или "стереохимически изомерные формы" выше или ниже в настоящем документе применяются взаимозаменяемо.

Настоящее изобретение включает все стереоизомеры соединений в соответствии с настоящим изобретением либо в виде чистых стереоизомеров, либо в виде смеси двух или более стереоизомеров.

Энантиомеры являются стереоизомерами, которые представляют собой несовпадающие при наложении зеркальные изображения друг друга. Смесь 1:1 пары энантиомеров представляет собой рацемат или рацемическую смесь.

Диастереомеры (или диастереоизомеры) представляют собой стереоизомеры, которые не являются энантиомерами, т.е. они не соотносятся как зеркальные изображения. Если соединение содержит двойную связь, заместители могут находиться в *E*- или *Z*-конфигурации. Если соединение содержит по меньшей мере двузамещенную неароматическую циклическую группу, заместители могут находиться в *цис*- или *транс*-конфигурации.

Таким образом, настоящее изобретение включает энантиомеры, диастереомеры, рацематы, *E*-изомеры, *Z*-изомеры, *цис*-изомеры,

транс-изомеры и их смеси во всех случаях, когда это возможно с химической точки зрения.

Значения всех этих терминов, т.е. энантиомеры, диастереомеры, рацематы, Е-изомеры, Z-изомеры, цис-изомеры, транс-изомеры и их смеси, известны специалисту в данной области.

Абсолютная конфигурация определяется согласно системе Кана-Ингольда-Прелога. Конфигурация при асимметричном атоме определяется как R или как S. Выделенные стереоизомеры, абсолютная конфигурация которых неизвестна, могут быть обозначены как (+) или (-) в зависимости от направления, в котором они вращают плоскополяризованный свет. Например, выделенные энантиомеры, абсолютная конфигурация которых неизвестна, могут обозначаться как (+) или (-) в зависимости от направления, в котором они вращают плоскополяризованный свет.

Если определяют конкретный стереоизомер, это означает, что указанный стереоизомер практически свободен от других стереоизомеров, т.е. связан с менее 50%, предпочтительно с менее 20%, более предпочтительно с менее 10%, еще более предпочтительно с менее 5%, в частности, с менее 2% и наиболее предпочтительно с менее 1% таковых. Таким образом, если соединение формулы (I) указывают, например, как (R), это означает, что соединение практически не содержит (S) изомер; если соединение формулы (I) указывают, например, как E, это означает, что соединение практически не содержит Z-изомер; если соединение формулы (I) указывают, например, как цис-, это означает, что соединение практически не содержит транс-изомер.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) включают их соли присоединения кислоты и основные соли. Подходящие соли присоединения кислоты образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Подходящие основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением также могут существовать в несольватированной и сольватированной формах. Термин "сольват" используется в данном документе для описания молекулярного комплекса, содержащего соединение в

соответствии с настоящим изобретением и одну или несколько молекул фармацевтически приемлемого растворителя, например, этанола.

Термин "полиморф" относится к способности соединения в соответствии с настоящим изобретением существовать в более чем одной форме или кристаллической структуре.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в виде кристаллических или аморфных продуктов. Они могут быть получены, например, в виде твердой прессованной массы, порошков или пленок посредством таких способов, как осаждение, кристаллизация, лиофильная сушка, сушка распылением или сушка выпариванием. Их можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими соединениями в соответствии с настоящим изобретением или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами. Как правило, их будут вводить в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Термин "наполнитель" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения (соединений) в соответствии с настоящим изобретением. Выбор наполнителя в большей степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть упомянуты все композиции, обычно используемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли присоединения, в качестве активного ингредиента объединяют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может принимать широкое разнообразие форм в зависимости от формы препарата, требуемого для введения. Данные фармацевтические композиции предпочтительно представлены в виде

единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального, ректального или чрескожного введения. Например, при получении композиций в виде пероральной лекарственной формы можно использовать любую общепринятую фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п., в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и т.п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Благодаря простоте их введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные пероральные формы единиц дозирования, в случае которых, разумеется, применяют твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые могут быть преобразованы непосредственно перед применением в препараты в жидких формах. В композициях, подходящих для чрескожного введения, носитель необязательно включает средство, повышающее проницаемость, и/или подходящее смачивающее средство, необязательно в комбинации с подходящими добавками любой природы в минимальных пропорциях, при этом добавки не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Указанные добавки могут облегчать введение в кожу и/или могут быть полезными при получении необходимых композиций. Данные композиции можно вводить различными путями, например, в форме трансдермального пластыря, в форме точечного нанесения, в форме мази. Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно также вводить посредством ингаляции или инсуффляции с помощью способов и составов, применяемых в данной области для введения таким путем. Таким образом, в основном соединения в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в легкие в форме раствора, суспензии или сухого порошка.

Особенно предпочтительно составление вышеуказанных фармацевтических композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, применяемая в настоящем документе, относится к физически отдельным единицам, подходящим

в качестве единичных доз, при этом каждая единица содержит предварительно установленное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких единичных лекарственных форм являются таблетки (включая делимые таблетки или покрытые оболочкой таблетки), капсулы, пилюли, пакетики с порошком, пластинки, суппозитории, растворы или суспензии для инъекций и т.п., а также их отдельные множества.

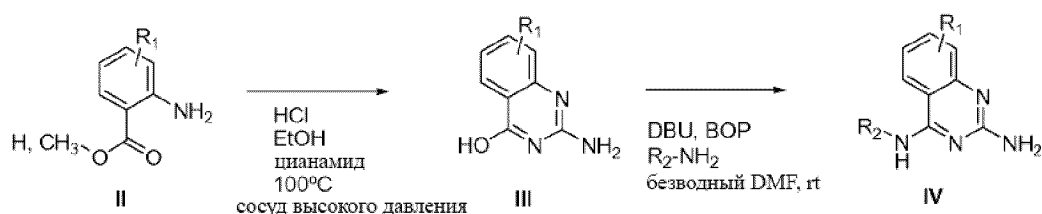
Специалисты в области лечения инфекционных заболеваний смогут определить эффективное количество, исходя из результатов тестов, представленных далее в данном документе. В целом, предполагается, что эффективное суточное количество будет составлять от 0,01 мг/кг до 50 мг/кг массы тела, более предпочтительно от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела. Может быть целесообразным введение необходимой дозы в виде двух, трех, четырех или более частей дозы с соответствующими интервалами в течение суток. Указанные части дозы могут быть составлены в виде единичных лекарственных форм, например, содержащих от 1 до 1000 мг и, в частности, от 5 до 200 мг активного ингредиента на единичную лекарственную форму.

Точная дозировка и частота введения зависят от конкретного используемого соединения формулы (I), конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, веса и общего физического состояния конкретного пациента, а также другого медикаментозного лечения, которое может получать индивидуум, что хорошо известно специалистам в данной области. Более того, очевидно, что эффективное количество может быть уменьшено или увеличено в зависимости от реакции подвергаемого лечению субъекта и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединение в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества являются только рекомендациями и не предназначены для ограничения в той или иной мере объема или применения настоящего изобретения.

Получение соединений формулы (I)

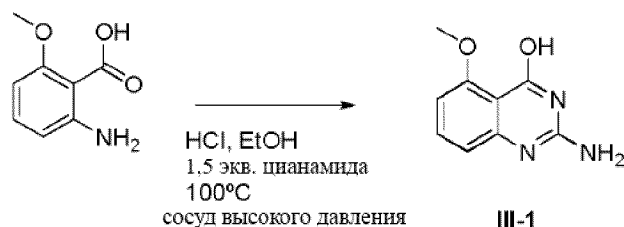
Соединения формулы (I) получают согласно схеме 1. Замещенные сложные эфиры антраниловой кислоты или антраниловые кислоты (II) нагревали в кислой среде в присутствии избыточного цианамид с применением спиртового растворителя (например, этанола) или диглима в соответствии со способом, описанным в литературе (O'Hara et. al. JOC (1991) 56, p776). Последующее замещение на аминогруппу 2-амино-4-гидроксихиназолинов (III) может происходить с помощью средства для реакции сочетания, как, например, BOP или PyBOP, в присутствии DBU и амина в полярном апротонном растворителе (например, DMF).

Схема 1:



Экспериментальная часть

Общая процедура получения замещенного 2-амино-4-гидроксихиназолина



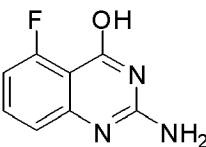
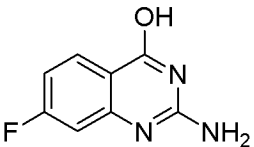
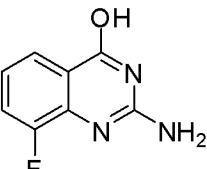
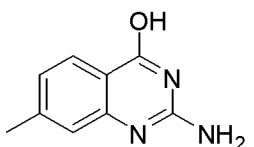
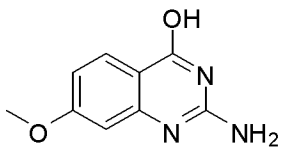
В 500 мл сосуд высокого давления, оснащенный магнитной мешалкой, помещали 2-амино-6-метоксибензойную кислоту (25 г, 149,6 ммоль), этанол (200 мл), цианамид (9,43 г, 224 ммоль) и концентрированную HCl (6 мл). Обеспечивали перемешивание смеси при 100°C в течение 16 ч. Реакционной смеси давали охладиться до комнатной температуры и твердые вещества выделяли посредством фильтрации и промывали этанолом и DIPE. Неочищенный продукт сушили в вакууме при 50°C с получением грязно-белого твердого вещества.

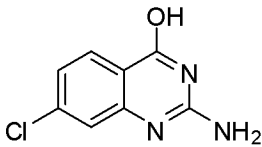
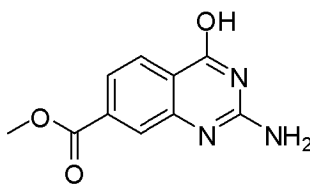
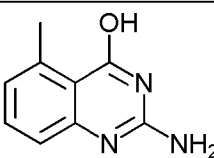
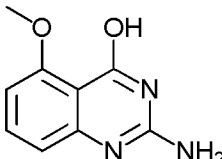
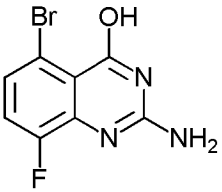
LC-MS масса/заряд = 192 (M+H)

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 3,88 (с, 3H), 6,96 (дд, $J=8,2, 3,1$ Гц, 2H), 7,69 (т, $J=8,3$ Гц, 1H), 8,28 (уш. с, 2H), 12,67 (уш. с, 1H)

Таблица I

Соединения формулы (III). Следующие промежуточные продукты получали в соответствии со способом получения III-1.

№	СТРУКТУРА	^1H ЯМР	LCMS (M+H) ⁺
1		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 6,98 (дд, $J=11,0, 8,3$ Гц, 1H), 7,13 (д, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,51 (уш. с, 2H), 7,64 (тд, $J=8,3, 5,8$ Гц, 1H), 12,30 (уш. с, 1H)	180
2		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 7,01-7,16 (м, 2H), 7,56 (уш. с, 2H), 7,99 (т, $J=7,7$ Гц, 1H), 10,38-13,48 (м, 1H)	180
3		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 6,51-6,67 (м, 2H), 7,00-7,08 (м, 1H), 7,42 (ддд, $J=11,2, 7,9, 1,3$ Гц, 1H), 7,69 (дд, $J=7,9, 0,6$ Гц, 1H), 11,08 (уш. с, 1H)	180
4		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 2,43 (с, 3H), 7,22 (д, $J=1,0$ Гц, 1H), 7,24 (с, 1H), 7,89 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 8,29 (уш. с, 2H), 12,65 (уш. с, 1H)	176
5		данные отсутствуют	192

6		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 7,41 (дд, $J=8,5$, 2,0 Гц, 1H), 7,55 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,98 (д, $J=8,5$ Гц, 1H), 8,49 (уш. с, 2H), 10,79–13,69 (м, 1H)	196
7		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 3,87–3,95 (м, 3H), 7,12–7,47 (м, 1H), 7,83 (дд, $J=8,3$, 1,4 Гц, 1H), 7,99 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 8,07–8,13 (м, 1H), 8,43 (уш. с, 2H)	220
8		данные отсутствуют	174 (M-H) $^-$
9		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 3,74–3,82 (м, 3H), 6,42 (уш. с, 2H), 6,62 (д, $J=7,7$ Гц, 1H), 6,75 (дд, $J=8,3$, 0,8 Гц, 1H), 7,44 (т, $J=8,3$ Гц, 1H), 10,91 (уш. с, 1H)	192
10		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 7,40 (дд, $J=8,7$, 4,7 Гц, 1H), 7,48 (т, $J=8,8$ Гц, 1H)	NA

Общая процедура получения соединения IV

Соединение III (1,5 ммоль) и DBU (3,75 ммоль) растворяли в 5 мл DMF в 30 мл стеклянной пробирке. Через 5 минут добавляли ВОР (1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 минут и затем добавляли амин (2,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью препаративной HPLC на (RP Vydac Denali C18-10 мкм, 250 г, 5 см). Подвижная фаза (0,25% раствор NH_4HCO_3 в воде,

MeOH), необходимые фракции собирали, выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением продукта в виде твердого вещества.

Общая процедура получения соединений 22, 23, 24, 26, 27 и 28

Соединение 8 формулы (I) (см. таблицу II) (2,1 г, 6,5 ммоль) вносили в THF (50 мл), добавляли LiOH (409 мг, 9,74 ммоль), за которым следовало добавление MeOH (5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Растворители выпаривали до тех пор, пока не оставалась только вода. Добавляли 10 мл 1 М HCl и соединение экстрагировали 2-метилтетрагидрофураном (2×25 мл). Объединенные органические слои высушивали над MgSO₄ и растворители удаляли при пониженном давлении с получением 2-амино-4-[1-(2-пиридил)этиламино]хиназолин-7-карбоновой кислоты в виде белого твердого вещества.

2-Амино-4-[1-(2-пиридил)этиламино]хиназолин-7-карбоновую кислоту (200 мг, 0,65 ммоль) и PyBOP (421 мг, 0,81 ммоль) растворяли в DMF (5 мл) в 30 мл стеклянной пробирке. Через 5 минут добавляли основание Хунига (0,557 мл, 3,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 минут и затем добавляли амин. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью препаративной HPLC на (RP Vydac Denali C18-10 мкм, 250 г, 5 см). Подвижная фаза (0,25% раствор NH₄HCO₃ в воде, MeOH), необходимые фракции собирали, выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением продукта в виде твердого вещества.

Процедура получения соединения 29

Соединение 12 формулы (I) (см. таблицу II) (1500 мг, 4,78 ммоль) и пиридина гидрохлорид (3,32 г, 28,7 ммоль) растворяли в пиридине (20 мл) и нагревали до 120°C в течение 16 ч. Пиридин удаляли при пониженном давлении. Остаточную фракцию гасили раствором NaHCO₃ (нас., водн.). Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакууме при 50°C с получением коричневого твердого вещества, которое очищали с помощью

препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP Vydac Denali C18-10 мкм, 200 г, 5 см), подвижная фаза: 0,25% раствор NH_4HCO_3 в воде, CH_3CN), необходимые фракции собирали, выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением 2-амино-4-[(5-метилизоксазол-3-ил)метиламино]хиназолин-5-ола (100 мг) в виде твердого вещества.

2-Амино-4-[(5-метилизоксазол-3-ил)метиламино]хиназолин-5-ол (40 мг, 0,15 ммоль) и Cs_2CO_3 (144 мг, 0,44 ммоль) растворяли в DMF (7,5 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавляли 2-бромэтилметилвый простой эфир (0,018 мл, 0,18 ммоль) и всю смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении и неочищенный остаток нейтрализовали 1 М HCl и очищали с помощью препаративной HPLC на (RP Vydac Denali C18-10 мкм, 250 г, 5 см). Подвижная фаза (0,25% раствор NH_4HCO_3 в воде, MeOH), необходимые фракции собирали, выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением соединения 29 в виде твердого вещества.

Процедура получения соединения 30

В атмосфере N_2 75 мл автоклав из нержавеющей стали наполняли 2-амино-5-бром-хиназолин-4-олом (3 г, 12,5 ммоль), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (56 мг, 0,25 ммоль), 1,3-бис(дифенилфосфино)пропаном (206 мг, 0,5 ммоль), ацетатом калия (2,45 г, 25 ммоль), метанолом (25 мл) и THF (30 мл). Автоклав закрывали и подавали газ CO под давлением 50 бар и реакцию осуществляли в течение 16 часов при 100°C . Образованный осадок удаляли путем фильтрации с получением метил-2-амино-4-гидрокси-хиназолин-5-карбоксилата (2,35 г).

Метил-2-амино-4-гидрокси-хиназолин-5-карбоксилат (2,35 г) в THF (10 мл) охлаждали до 0°C . Затем добавляли LiAlH_4 . Смеси позволяли достичь комнатной температуры и ее перемешивали в течение 16 часов. EtOAc (5 мл) добавляли каплями при 0°C , затем добавляли 3 г $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ и всю смесь перемешивали в течение 30 минут. Осадок отфильтровывали и фильтрат высушивали с помощью MgSO_4 , фильтровали и выпаривали досуха с получением 2-амино-5-

(гидроксиметил)хиназолин-4-ола (750 мг) в виде желтого твердого вещества.

2-Амино-5-(гидроксиметил)хиназолин-4-ол (300 мг, 1,57 ммоль) суспендировали в THF (20 мл) с помощью DBU (0,586 мл, 3,92 ммоль), через 5 минут добавляли BOP (833 мг, 1,88 ммоль). Через 15 минут добавляли (5-метил-3-изоксазолил)метиламин (0,320 мл, 3,14 ммоль). Смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении и неочищенный продукт очищали с помощью препаративной HPLC на (RP Vydac Denali C18-10 мкм, 250 г, 5 см). Подвижная фаза (0,25% раствор NH_4HCO_3 в воде, MeOH), необходимые фракции собирали, выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением соединения 30 в виде твердого вещества (119 мг).

Процедура получения соединения 31

Свежеполученный раствор NaOMe (1,25 мл, 6,25 ммоль) добавляли в атмосфере N_2 к смеси 2-амино-5-бром-8-фтор-хиназолин-4-ола (500 мг, 1,94 ммоль), бромида меди (I) (39 мг, 0,27 ммоль), EtOAc (0,076 мл, 0,78 ммоль) в MeOH (5 мл). Смесь нагревали в сосуде высокого давления до температуры дефлегмирования в течение 16 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP Vydac Denali C18-10 мкм, 200 г, 5 см), подвижная фаза: 0,25% раствор NH_4HCO_3 в воде, MeOH), необходимые фракции собирали, выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением 2-амино-8-фтор-5-метокси-хиназолин-4-ола (150 мг) в виде твердого вещества.

2-Амино-8-фтор-5-метокси-хиназолин-4-ол (150 мг, 0,72 ммоль) вносили в DMF (10 мл), добавляли DBU (0,536 мл, 3,59 ммоль) и затем добавляли реагент BOP (396 мг, 0,90 ммоль). Реакционную смесь перемешивали и, когда она становилась гомогенной, добавляли (5-метил-3-изоксазолил)метиламин (0,115 мл, 1,08 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали с помощью препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP Vydac Denali C18-10 мкм, 200 г, 5 см, подвижная фаза: 0,25% раствор NH_4HCO_3 в воде, MeOH), необходимые фракции собирали,

выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением соединения 31 в виде твердого вещества (64 мг).

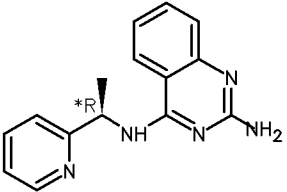
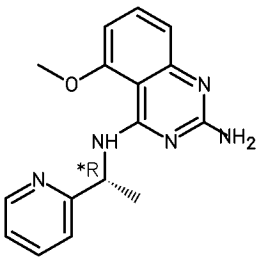
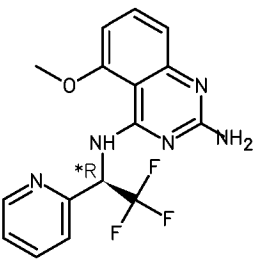
Процедура получения соединения 32

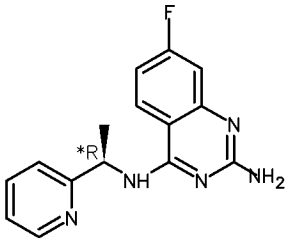
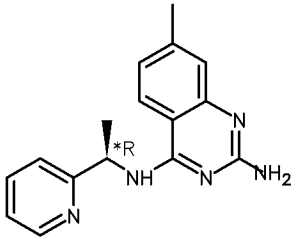
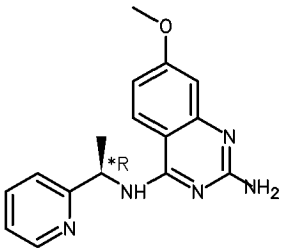
Соединение 31 (52,5 мг, 0,173 ммоль) и пиридина гидрохлорид (0,12 г, 1,039 ммоль) в 1 мл пиридина нагревали до 120°C в течение 16 часов. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток гасили раствором NaHCO₃ (нас., водн.). Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакууме при 50°C с получением 2-амино-8-фтор-4-[(5-метилизоксазол-3-ил)метиламино]хиназолин-5-ола (10 мг) в виде коричневого твердого вещества.

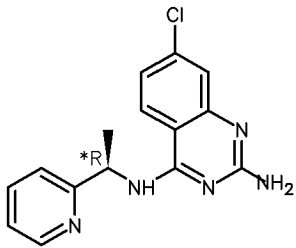
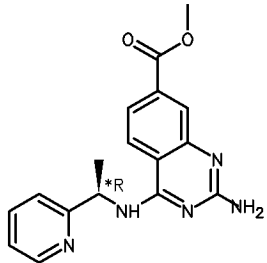
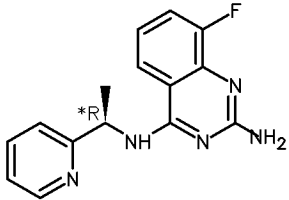
2-Амино-8-фтор-4-[(5-метилизоксазол-3-ил)метиламино]хиназолин-5-ол (10 мг, 0,035 ммоль) и Cs₂CO₃ (33,8 мг, 0,104 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавляли 2-хлорэтилметилловый простой эфир (4,1 мг, 0,043 ммоль) и всю смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в MeOH и осадок (соли) удаляли с помощью фильтрации. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и неочищенный остаток очищали с помощью препаративной HPLC на (неподвижная фаза: RP SunFire Prep C18 OBD-10 мкм, 30×150 мм), подвижная фаза: 0,25% раствор NH₄HCO₃ в воде, CH₃CN), необходимые фракции собирали, выпаривали, растворяли в MeOH и снова выпаривали с получением соединения 32 в виде твердого вещества (2 мг).

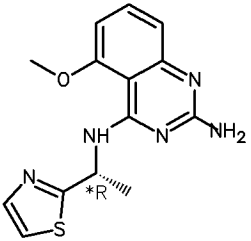
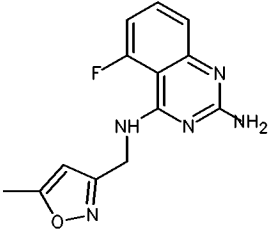
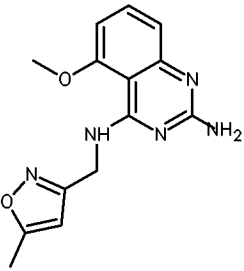
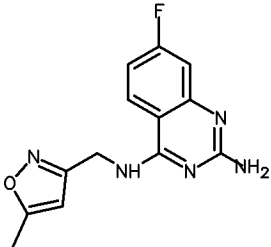
Таблица II

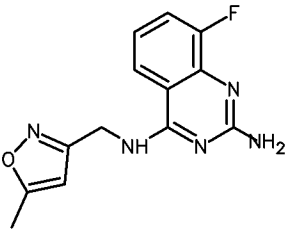
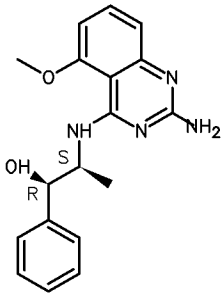
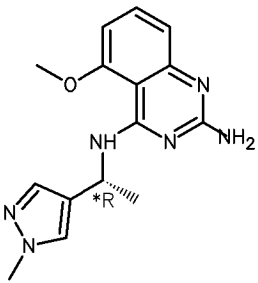
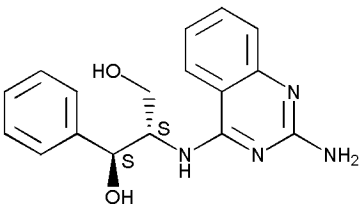
Соединения формулы (I). Следующие соединения синтезировали согласно одному из способов, описанных выше.

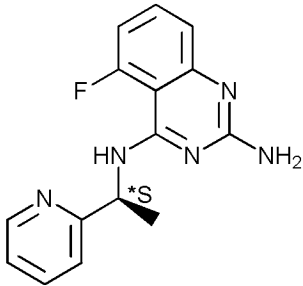
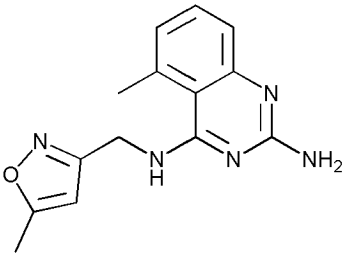
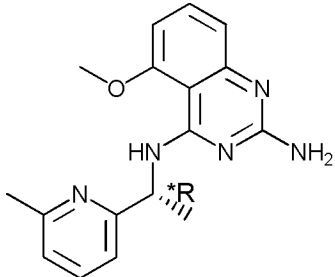
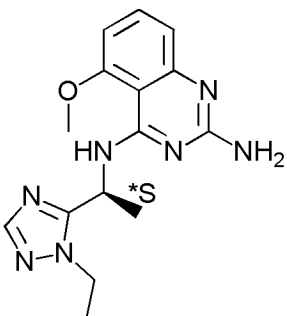
№	СТРУКТУРА	Н ЯМР
1		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,60 (д, $J=7,3$ Гц, 3H), 5,61 (квинтет, $J=7,3$ Гц, 1H), 5,97 (с, 2H), 7,05 (ддд, $J=8,1$ 6,9, 1,2 Гц, 1H), 7,20 (дд, $J=8,4$, 0,7 Гц, 1H), 7,24 (ддд, $J=7,5$, 4,8, 0,9 Гц, 1H), 7,44 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,49 (ддд, $J=8,3$, 6,9, 1,3 Гц, 1H), 7,72 (тд, $J=7,7$, 1,8 Гц, 1H), 8,05 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,18 (дд, $J=8,3$, 1,0 Гц, 1H), 8,50-8,56 (м, 1H)
2		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,53 (д, $J=6,82$ Гц, 3H) 3,99 (с, 3H) 5,43 (т, $J=6,82$ Гц, 1H) 6,03 (с, 2H) 6,53-6,69 (м, 1H) 6,81 (дд, $J=8,36$, 0,88 Гц, 1H) 7,32 (ддд, $J=7,48$, 4,84, 1,10 Гц, 1H) 7,38 (т, $J=8,14$ Гц, 1H) 7,46 (д, $J=7,92$ Гц, 1H) 7,80 (тд, $J=7,70$, 1,76 Гц, 1H) 8,54-8,72 (м, 1H) 9,01 (д, $J=7,04$ Гц, 1H)
3		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 4,05 (с, 3H), 6,25 (с, 2H), 6,43 (квинтет, $J=7,8$ Гц, 1H), 6,62-6,68 (м, 1H), 6,86 (дд, $J=8,4$, 0,9 Гц, 1H), 7,44 (т, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,52 (ддд, $J=7,7$, 4,8, 1,1 Гц, 1H), 7,69 (д, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,95 (тд, $J=7,7$, 1,8 Гц, 1H), 8,74-8,79 (м, 1H), 9,31 (д, $J=8,4$ Гц, 1H)

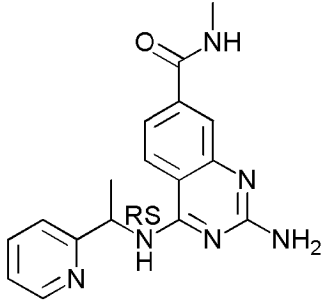
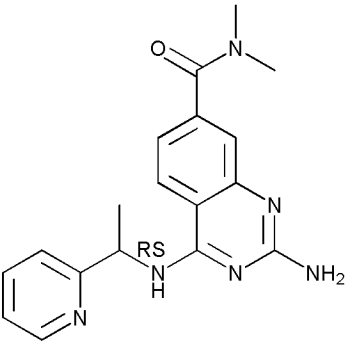
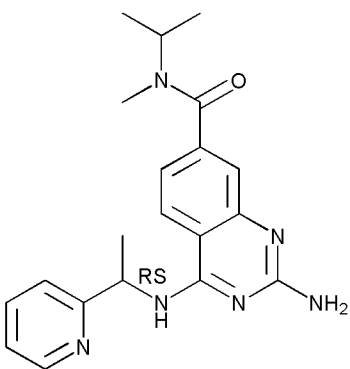
4		^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ- d) δ ч/млн 1,60 (д, $J=6,6$ Гц, 3H), 5,34 (уш. с, 2H), 5,49 (т, $J=6,8$ Гц, 1H), 6,78 (тд, $J=8,6$, 2,6 Гц, 1H), 7,02 (дд, $J=10,8$, 2,6 Гц, 1H), 7,19 (ддд, $J=7,5$, 4,8, 1,1 Гц, 1H), 7,26–7,31 (м, 1H), 7,59 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 7,65 (тд, $J=7,6$, 1,9 Гц, 1H), 7,73 (дд, $J=9,0$, 5,9 Гц, 1H), 8,53–8,61 (м, 1H)
5		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,58 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 2,35 (с, 3H), 5,59 (квинтет, $J=7,3$ Гц, 1H), 5,94 (с, 2H), 6,90 (дд, $J=8,3$, 1,2 Гц, 1H), 7,01 (с, 1 6 Н), 7,23 (дд, $J=6,9$, 5,2 Гц, 1H), 7,43 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,72 (тд, $J=7,7$, 1,8 Гц, 1H), 7,97 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,07 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 8,48–8,57 (м, 1H)
6		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,57 (д, $J=7,04$ Гц, 3H) 3,80 (с, 3H) 5,58 (т, $J=7,37$ Гц, 1H) 5,89 (с, 2H) 6,61 (д, $J=2,42$ Гц, 1H) 6,67 (дд, $J=8,91$, 2,53 Гц, 1H) 7,23 (ддд, $J=7,48$, 4,84, 0,88 Гц, 1H) 7,42 (д, $J=7,92$ Гц, 1H) 7,72 (тд, $J=7,70$, 1,76 Гц, 1H) 7,89 (д, $J=8,14$ Гц, 1H) 8,08 (д, $J=9,02$ Гц, 1H) 8,52 (дт, $J=3,96$, 0,88 Гц, 1H)

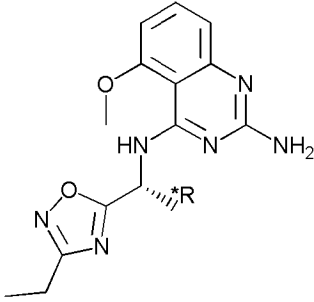
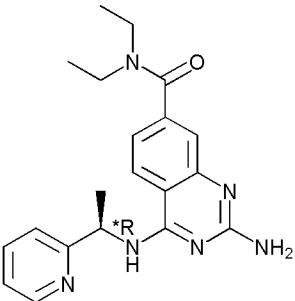
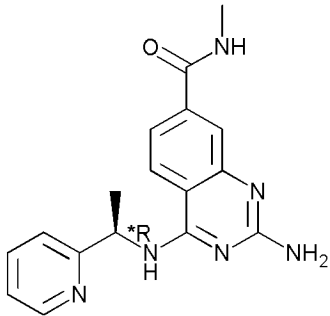
7		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,59 (д, $J=7,3$ Гц, 3H), 5,53-5,65 (м, 1H), 6,21 (уш. с, 2H), 7,07 (дд, $J=8,7, 2,1$ Гц, 1H), 7,18 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,24 (ддд, $J=7,4, 4,8, 1,0$ Гц, 1H), 7,43 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,73 (тд, $J=7,6, 1,9$ Гц, 1H), 8,19 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,23 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 8,50-8,56 (м, 1H)
8		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,60 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 3,88 (с, 3H), 5,61 (квинтет, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,22 (с, 2H), 7,25 (ддд, $J=7,5, 4,8, 0,9$ Гц, 1H), 7,45 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,54 (дд, $J=8,6, 1,8$ Гц, 1H), 7,70-7,77 (м, 2H), 8,28 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,32 (д, $J=8,6$ Гц, 1H), 8,51-8,57 (м, 1H)
9		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,60 (д, $J=7,04$ Гц, 3H) 5,61 (квинтет, $J=7,26$ Гц, 1H) 6,25 (уш. с, 2H) 6,99 (тд, $J=7,98, 4,95$ Гц, 1H) 7,25 (ддд, $J=7,48, 4,84, 0,88$ Гц, 1H) 7,29-7,36 (м, 1H) 7,44 (д, $J=7,92$ Гц, 1H) 7,73 (тд, $J=7,65, 1,87$ Гц, 1H) 8,01 (д, $J=8,14$ Гц, 1H) 8,17 (д, $J=8,14$ Гц, 1H) 8,52-8,59 (м, 1H)

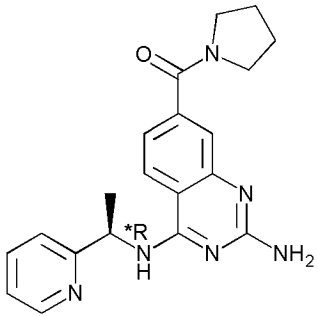
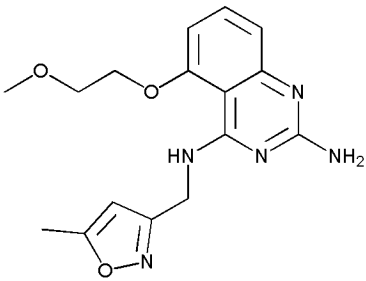
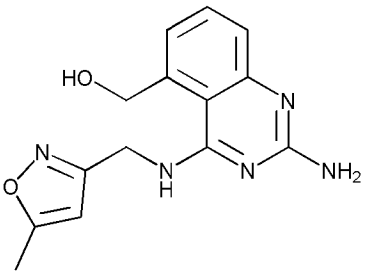
10		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,69 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 3,96 (с, 3H), 5,80 (квинтет, $J=7,1$ Гц, 1H), 6,09 (с, 2H), 6,60 (дд, $J=8,0$, 0,8 Гц, 1H), 6,83 (дд, $J=8,4$, 0,9 Гц, 1H), 7,40 (т, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,61 (д, $J=3,1$ Гц, 1H), 7,77 (д, $J=3,3$ Гц, 1H), 8,37 (д, $J=7,7$ Гц, 1H)
11		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 2,35 (д, $J=0,9$ Гц, 3H), 4,72 (д, $J=5,3$ Гц, 2H), 6,22 (д, $J=0,7$ Гц, 1H), 6,35 (с, 2H), 6,80 (ддд, $J=12,3$, 7,9, 0,9 Гц, 1H), 7,04 (дд, $J=8,4$, 0,9 Гц, 1H), 7,46 (тд, $J=8,2$, 6,5 Гц, 1H), 7,71-7,82 (м, 1H)
12		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 2,36 (д, $J=0,7$ Гц, 3H), 3,92 (с, 3H), 4,70 (д, $J=5,7$ Гц, 2H), 6,05 (с, 2H), 6,20 (д, $J=0,7$ Гц, 1H), 6,56 (дд, $J=8,0$, 0,8 Гц, 1H), 6,81 (дд, $J=8,4$, 0,9 Гц, 1H), 7,38 (т, $J=8,1$ Гц, 1H), 8,40 (т, $J=5,8$ Гц, 1H)
13		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 2,33-2,38 (м, 3H), 4,67 (д, $J=5,9$ Гц, 2H), 6,18-6,24 (м, 1H), 6,27 (с, 2H), 6,85-6,92 (м, 2H), 7,99-8,07 (м, 1H), 8,42 (т, $J=5,7$ Гц, 1H)

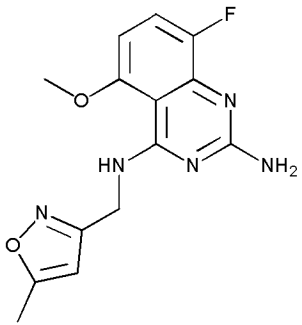
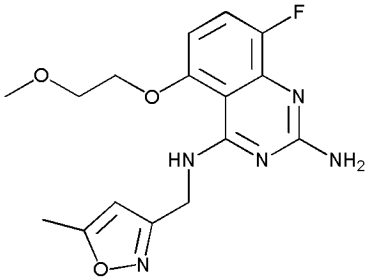
14		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 2,35 (д, $J=0,9$ Гц, 3H), 4,69 (д, $J=5,9$ Гц, 2H), 6,22 (д, $J=0,9$ Гц, 1H), 6,39 (уш. с, 2H), 6,98 (тд, $J=8,0$, 4,8 Гц, 1H), 7,33 (ддд, $J=11,4$, 7,8, 1,1 Гц, 1H), 7,79 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 8,48 (т, $J=5,8$ Гц, 1H)
15		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 0,97 (д, $J=6,6$ Гц, 3H), 3,92 (с, 3H), 4,44-4,55 (м, 1H), 4,89 (д, $J=3,1$ Гц, 1H), 5,69 (уш. с, 1H), 6,06 (с, 2H), 6,52-6,58 (м, 1H), 6,79 (дд, $J=8,3$, 0,8 Гц, 1H), 7,22-7,29 (м, 1H), 7,32-7,41 (м, 3H), 7,43-7,49 (м, 2H), 8,07 (д, $J=7,9$ Гц, 1H)
16		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,51 (д, $J=6,8$ Гц, 3H), 3,79 (с, 3H), 3,90 (с, 3H), 5,39 (квинтет, $J=7,0$ Гц, 1H), 6,05 (с, 2H), 6,52-6,58 (м, 1H), 6,79 (дд, $J=8,4$, 0,9 Гц, 1H), 7,35 (т, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,45 (с, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,84 (д, $J=7,7$ Гц, 1H)
17		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 3,40-3,49 (м, 1H), 3,60-3,71 (м, 1H), 4,45-4,55 (м, 1H), 4,79 (уш. с, 1H), 4,97-5,05 (м, 1H), 5,62 (д, $J=4,8$ 6 Гц, 1H), 5,98 (с, 2H), 7,02 (т, $J=7,5$ Гц, 1H), 7,08 (д, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,13-7,21 (м, 2H), 7,27 (т, $J=7,5$ Гц, 2H), 7,38 (д, $J=7,3$ Гц, 2H), 7,42-7,50 (м, 1H), 7,95 (д, $J=8,3$ Гц, 1H)

18		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,55 (д, $J=6,82$ Гц, 3H) 5,49 (тд, $J=6,77$, 2,09 Гц, 1H) 6,32 (с, 2H) 6,82 (ддд, $J=12,76$, 7,92, 0,88 Гц, 1H) 7,05 (дд, $J=8,47$, 0,99 Гц, 1H) 7,33 (ддд, $J=7,54$, 4,90, 0,99 Гц, 1H) 7,42-7,57 (м, 2H) 7,82 (тд, $J=7,70$, 1,76 Гц, 1H) 7,93 (дд, $J=14,63$, 6,93 Гц, 1H) 8,58-8,67 (м, 1H)
19		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 2,33-2,39 (м, 3H), 2,75 (с, 3H), 4,71 (д, $J=5,3$ Гц, 2H), 6,06 (с, 2H), 6,22-6,26 (м, 1H), 6,82 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 7,08 (д, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,13 (т, $J=5,3$ Гц, 1H), 7,32 (дд, $J=8,4$, 7,3 Гц, 1H)
20		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,49 (д, $J=6,6$ Гц, 3H), 2,58 (с, 3H), 4,02 (с, 3H), 5,37 (квинтет, $J=6,6$ Гц, 1H), 6,02 (с, 2H), 6,56-6,62 (м, 1H), 6,81 6 (дд, $J=8,3$, 0,8 Гц, 1H), 7,20 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 7,24 (д, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,37 (т, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,70 (т, $J=7,7$ Гц, 1H), 9,21 (д, $J=6,8$ Гц, 1H)
21		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,36 (т, $J=7,3$ Гц, 3H), 1,57 (д, $J=6,8$ Гц, 3H), 3,95 (с, 3H), 4,21-4,42 (м, 2H), 5,65 (квинтет, $J=7,0$ Гц, 1H), 6,08 (уш. с, 2H), 6,58 (дд, $J=7,9$, 0,7 Гц, 1H), 6,81 (дд, $J=8,4$, 0,7 Гц, 1H), 7,39 (т, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,88 (с, 1H), 8,26 (д, $J=7,7$ Гц, 1H)

22		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,60 (д, $J=7,3$ Гц, 3H), 2,80 (д, $J=4,4$ Гц, 3H), 5,60 (квинтет, $J=7,3$ Гц, 1H), 6,11 (с, 2H), 7,24 (ддд, $J=7,4, 4,8, 1,0$ Гц, 1H), 7,45 (дт, $J=8,4, 1,8$ Гц, 2H), 7,65 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 7,73 (тд, $J=7,7, 1,8$ Гц, 1H), 8,16 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,25 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 8,49-8,56 (м, 2H)
23		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,60 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 2,91 (с, 3H), 3,00 (с, 3H), 5,61 (квинтет, $J=7,3$ Гц, 1H), 6,12 (с, 2H), 7,02 (ддд, $J=8,3, 1,7$ Гц, 1 6 Н), 7,12 (д, $J=1,5$ Гц, 1H), 7,24 (ддд, $J=7,5, 4,8, 0,9$ Гц, 1H), 7,44 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,73 (тд, $J=7,7, 1,8$ Гц, 1H), 8,16 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,24 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 8,51-8,56 (м, 1H)
24		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,03-1,20 (м, 6 Н), 1,60 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 2,68-2,89 (м, 3H), 3,76-3,91 (м, 1H), 5,61 (квинтет, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,13 (уш. с, 2H), 6,94-7,02 (м, 1H), 7,02-7,12 (м, 1H), 7,24 (ддд, $J=7,4, 4,8, 1,0$ Гц, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,73 (тд, $J=7,7, 2,0$ Гц, 1H), 8,15 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 8,50-8,57 (м, 1H)

25		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,23 (т, $J=7,5$ Гц, 3H), 1,68 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 2,71 (кв, $J=7,6$ Гц, 2H), 3,96 (с, 3H), 5,71 (квинтет, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,05 (уш. с, 2H), 6,57-6,62 (м, 1H), 6,83 (дд, $J=8,5, 0,8$ Гц, 1H), 7,41 (т, $J=8,1$ Гц, 1H), 8,31 (д, $J=7,5$ Гц, 1H)
26		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,05 (уш. с, 3H), 1,16 (уш. с, 3H), 1,60 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 3,20 (уш. с, 2H), 3,43 (уш. с, 2H), 5,60 (квинтет, $J=7,3$ Гц, 1H), 6,11 (с, 2H), 6,97 (дд, $J=8,3, 1,7$ Гц, 1H), 7,05 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 7,24 (ддд, $J=7,4, 4,8, 1,0$ Гц, 1H), 7,45 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,73 (тд, $J=7,6, 1,9$ Гц, 1H), 8,15 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,24 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 8,50-8,56 (м, 1H)
27		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 1,60 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 2,79 (д, $J=4,4$ Гц, 3H), 5,60 (квинтет, $J=7,3$ Гц, 1H), 6,09 (с, 2H), 7,24 (ддд, $J=7,4, 4,8, 1,0$ Гц, 1H), 7,41-7,48 (м, 2H), 7,65 (д, $J=1,5$ Гц, 1H), 7,73 (тд, $J=7,7, 2,0$ Гц, 1H), 8,15 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,24 (д, $J=8,6$ Гц, 1H), 8,48-8,56 (м, 2H)

28		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 1,60 (д, $J=7,0$ Гц, 3H), 1,76-1,93 (м, 4 H), 3,37 (т, $J=6,5$ Гц, 2H), 3,47 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 5,60 (квинтет, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,10 (с, 2H), 7,12 (дд, $J=8,3, 1,7$ Гц, 1H), 7,22 (д, $J=1,5$ Гц, 1H), 7,23-7,26 (м, 1H), 7,44 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,73 (тд, $J=7,7, 1,8$ Гц, 1H), 8,15 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 8,23 (д, $J=8,6$ Гц, 1H), 8,50-8,56 (м, 1H)
29		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 2,33-2,42 (м, 3H) 3,27 (с, 3H) 3,64-3,80 (м, 2H) 4,16-4,31 (м, 2H) 4,69 (д, $J=5,50$ Гц, 2H) 6,12 (с, 2H) 6,21-6,29 (м, 1H) 6,59 (д, $J=7,48$ Гц, 1H) 6,82 (д, $J=7,70$ Гц, 1H) 7,37 (т, $J=8,25$ Гц, 1H) 8,37 (с, 1H)
30		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ч/млн 0,87 (т, $J=7,26$ Гц, 3H) 1,23-1,38 (м, 2H) 1,38-1,49 (м, 2H) 1,54 (д, $J=7,04$ Гц, 3H) 3,33-3,50 (м, 2H) 5,38 (т, $J=7,26$ Гц, 1H) 6,10 (с, 2H) 7,05 (дд, $J=7,04, 1,32$ Гц, 1H) 7,30 (дд, $J=8,47, 1,21$ Гц, 1H) 7,48 (дд, $J=8,36, 7,04$ Гц, 1H) 7,53 (дд, $J=1,87, 0,77$ Гц, 1H) 7,68 (т, $J=4,73$ Гц, 1H) 9,09 (д, $J=1,98$ Гц, 1H) 9,39 (д, $J=8,14$ Гц, 1H)

31		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ч/млн 2,28–2,40 (м, 3H) 3,90 (с, 3H) 4,71 (д, $J=5,94$ Гц, 2H) 6,21 (д, $J=0,88$ Гц, 1H) 6,33 (уш. с, 2H) 6,46 (дд, $J=8,80, 3,52$ Гц, 1H) 7,26 (дд, $J=10,89, 8,69$ Гц, 1H) 8,49 (т, $J=5,72$ Гц, 1H)
32		данные отсутствуют

Способы очистки с помощью SFC

Общая процедура

Разделение сверхкритической жидкостной хроматографией (SFC) осуществляли со сверхкритическим CO_2 и модификатором, который указан в таблице, используя колонку, которая указана в таблице.

Таблица III

Соединения формулы (I).

Следующие соединения выделяли SFC-разделением.

№	Колонка	Модификатор
1	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	iPrOH с 0,2% iPrNH ₂
2	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	MeOH с 0,2% iPrNH ₂
3	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	iPrOH с 0,2% iPrNH ₂
4	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	iPrOH с 0,2% iPrNH ₂
5	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	iPrOH с 0,4% iPrNH ₂
6	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	EtOH с 0,2% iPrNH ₂
7	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	iPrOH с 0,2% iPrNH ₂
8	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	iPrOH с 0,2% iPrNH ₂
9	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	EtOH с 0,2% iPrNH ₂
10	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	EtOH с 0,4% iPrNH ₂

16	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	EtOH с 0,2% iPrNH ₂
18	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	iPrOH с 0,2% iPrNH ₂
20	Chiralpak Diacel AS 20×250 мм	EtOH с 0,2% iPrNH ₂
21	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	EtOH с 0,2% iPrNH ₂
25	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	MeOH с 0,4% iPrNH ₂
26	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	EtOH с 0,2% <u>iPrNH₂</u>
27	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	MeOH с 0,4% iPrNH ₂
28	Chiralpak Diacel AD 30×250 мм	EtOH с 0,4% iPrNH ₂

Для всех соединений первое элюируемое соединение обозначали как *R.

*R означает энантиомерную чистую конфигурацию, абсолютная стереохимия которой неизвестна.

Аналитические способы

Общая процедура

Измерения в ходе высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) проводили с помощью насоса для LC, детектора на диодной матрице (DAD) или УФ-детектора и колонки, которая определена в соответствующих способах. При необходимости включали дополнительные детекторы (см. приведенную ниже таблицу способов).

Поток из колонки направляли в масс-спектрометр (MS), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В компетенции специалиста в данной области находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, минимального времени измерения и т.д.) с целью получения ионов, дающих возможность определения номинального моноизотопного молекулярного веса (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Соединения описывают по их экспериментальному времени удержания (R_t) и ионам. Если не указано иного, в таблице данных, указанный молекулярный ион соответствует $[M+H]^+$ (протонированная молекула) и/или $[M-H]^-$ (депротонированная молекула). В случае, если соединение не было непосредственно способно к ионизации, указывают тип аддукта (т.е. $[M+NH_4]^+$,

[M+HCOO]⁻, и т.д.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl.,) описанное значение является таковым, которое получено для наименьшей изотопной массы. Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно ассоциированы с применяемым способом.

Далее в данном документе "SQD" означает одиночный квадрупольный детектор, "MSD" означает масс-селективный детектор, "RT" означает комнатную температуру, "BEH" означает мостиковый гибрид этилсилоксан/диоксид кремния, "DAD" означает детектор на диодной матрице, "HSS" означает диоксид кремния повышенной прочности.

Таблица IV

Коды способов LCMS (поток выражен в мл/мин.; температура колонки (Т) в °С;
время анализа в минутах).

Код способа	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток	Время анализа
					Колонка Т	
B7010 B7014	Waters: Acquity® UPLC®- DAD и SQD	Waters: HSS T3 (1,8 мкм, 2,1*100 мм)	А: 95% CH ₃ COONH ₄ 10 мМ + 5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90 мин., до 5% А за 0,5 мин.	0,8	3,5
					55	
B8011 B8002	Waters: Acquity® UPLC®- DAD и SQD	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1*50 мм)	А: 95% CH ₃ COONH ₄ 10 мМ + 5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин., поддержание в течение 0,7 мин.	0,8	2
					55	
B9007 B9008	Waters: Acquity® UPLC®- DAD и SQD	Waters: HSS T3 (1,8 мкм, 2,1*100 мм)	А: 95% CH ₃ COONH ₄ 10 мМ + 5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90 мин., до 5% А за 0,5 мин.	0,8	3,5
					55	

Таблица V

Соединения формулы (I). Следующие соединения характеризовали согласно одному из способов, описанных выше.

№	Код способа	Время удержания (мин.)	Полученная масса (M+N)
1	B7010B7014	0,61	266
2	B7010B7014	1,59	296
3	B9007B9008	1,61	350
4	B8011B8002	0,69	284
5	B7010B7014	1,39	280
6	B7010B7014	1,31	296
7	B8011B8002	0,78	300
8	B9007B9008	1,32	324
9	B9007B9008	1,29	284
10	B9007B9008	1,31	302
11	B8011B8002	0,69	274
12	B7010B7014	1,26	286
13	B8011B8002	0,64	274
14	B7010B7014	1,32	274
15	B8011B8002	0,77	325
16	B8011B8002	0,62	299
17	B8011B8002	0,53	311
18	B8011B8002	0,79	284
19	B8011B8002	0,65	270
20	B8011B8002	0,84	310
21	B8011B8002	0,61	314
22	B8011B8002	0,56	323
23	B8011B8002	0,59	337
24	B8011B8002	0,70	365
25	B8011B8002	0,75	315
26	B8011B8002	0,69	365
27	B8011B8002	0,56	323
28	B8011B8002	0,66	363
29	B8011B8002	0,70	330
30	B9007B9008	1,04	286
31	B9007B9008	1,36	304
32	B9007B9008	1,46	348

Биологическая активность соединений формулы (I)

Описание биологических анализов

Оценка активности TLR7 и TLR8

Способность соединений активировать TLR7 и/или TLR8 человека оценивали в анализе репортерного гена с использованием клеток HEK293, временно трансфицированных вектором экспрессии TLR7 или TLR8 и репортерной конструкцией NFκB-luc.

Вкратце, клетки HEK293 выращивали в культуральной среде (DMEM, дополненной 10% FCS и 2 mM глутамина). Для трансфекции клеток в 15-см чашках клетки отделяли трипсином-EDTA, трансфицировали смесью плазмиды CMV-TLR7 или TLR8 (1700 нг), плазмиды NFκB-luc (850 нг) и трансфекционного реагента и инкубировали в течение 48 ч. при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Трансфицированные клетки затем отмывали в PBS, отделяли трипсином-EDTA и ресуспендировали в среде с плотностью $1,25 \times 10^5$ клеток/мл. Сорок микролитров клеток затем распределяли в каждую лунку в 384-луночных планшетах, где уже содержалось 200 нл соединения в 100% DMSO. После 6 часов инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность путем добавления 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) в каждую лунку и считывали показания, полученные на устройстве для считывания микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Кривые зависимости доза-эффект были построены на основе измерений, выполненных в четырех повторах. Для каждого соединения определяли значения наиболее низких эффективных концентраций (LEC), определяемых как концентрация, которая вызывает эффект, который по меньшей мере в два раза превышает допустимое отклонение анализа.

Токсичность соединений определяли параллельно с использованием одинаковых серий разведений соединения-40 мкл на лунку с клетками, трансфицированными только конструкцией CMV-TLR7 ($1,25 \times 10^5$ клеток/мл), в 384-луночных планшетах. Жизнеспособность клеток измеряли после 6 часов инкубирования при 37°C, 5% CO₂ путем добавления 15 мкл ATP lite (Perkin Elmer) на лунку и считывания показаний устройством для считывания микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные

указывали как CC_{50} .

Параллельно использовали подобные серии разведений соединения (200 нл соединения в 100% DMSO) с 40 мкл на лунку клеток, трансфицированных только репортерной конструкцией NFkB-luc ($1,25 \times 10^5$ клеток/мл). Через шесть часов после инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность путем добавления 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) в каждую лунку и считывали показания, полученные на устройстве для считывания микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные обратного скрининга регистрировали как LEC.

Активация промоторных элементов ISRE

Способность соединений индуцировать IFN-I также оценивали посредством определения активации интерферон-зависимых регуляторных элементов (ISRE) при использовании сред, кондиционированных PBMC. Элемент ISRE последовательности GAAACTGAACT высокочувствителен к фактору транскрипции STAT1-STAT2-IRF9, активированному при связывании IFN-I с его рецептором IFNAR (Clontech, PT3372-5W). Плазмида pISRE-Luc от Clontech (образец 631913) содержит 5 копий данного элемента ISRE, за которыми следует ORF люциферазы светлячка. Получали клеточную линию HEK293, стабильно трансфицированную pISRE-Luc (HEK-ISREluc), для выращивания в средах, кондиционированных культурой клеток PBMC.

Вкратце, PBMC получали из лейкоцитарных пленок от по меньшей мере двух доноров с использованием стандартного протокола центрифугирования с фиколлом. Выделенные PBMC ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% сывороткой АВ человека, и 2×10^5 клеток/лунка распределяли в 384-луночных планшетах, содержащих соединения (общий объем 70 мкл). После инкубации в течение ночи 10 мкл надосадочной жидкости переносили в 384-луночные планшеты, содержащие 5×10^3 HEK-ISREluc клеток/лунка в 30 мкл (высеянных за день до этого). После 24 часов инкубации активацию элементов ISRE определяли посредством проведения анализа люциферазной активности с использованием 40 мкл/лунка субстрата Steady Lite Plus (Perkin

Elmer) и определяли с помощью устройства для считывания микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Стимулирующую активность каждого соединения в отношении клеток HEK-ISREluc отмечали в виде величины LEC, определенной как концентрация соединения, используемого в отношении PBMC, которая обуславливает люциферазную активность, превышающую по меньшей мере в два раза допустимое отклонение анализа. LEC в свою очередь указывает степень активации ISRE при переносе определенного количества культуральной среды PBMC. Рекомбинантный интерферон α -2a (Roferon-A) использовали в качестве стандартного контрольного соединения.

Таблица VI

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

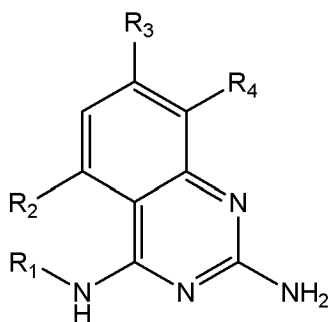
№	TLR 7 человека (LEC), мкМ	TLR 8 человека (LEC), мкМ	HEK-ISRE luc (LEC), мкМ
1	0,72	>25	0,61
2	0,94	>25	0,49
3	0,76	>25	0,47
4	0,92	19,8	0,59
5	0,53	14,7	0,11
6	3,75	>25	0,64
7	0,82	16,4	0,38
8	4,94	NA	2,11
9	5,21	>25	1,68
10	0,42	12,3	0,11
11	0,45	3,09	0,082
12	0,047	1,94	0,036
13	0,46	5,22	0,12
14	0,65	>25	0,13
15	0,61	>25	0,56
16	2,44	9,14	0,55
17	0,83	5,51	0,16
18	8,25	24,3	7,83
19	0,11	1,74	0,051
20	1,46	>25	0,62

21	6,1	8,85	0,54
22	14,7	>25	2,20
23	6,67	>25	1,62
24	14,3	11,0	1,75
25	1,95	6,62	0,49
26	2,14	>25	7,33
27	8,24	>25	5,04
28	2,24	>25	1,57
29	0,082	8,15	NA
30	0,63	9,0	0,14
31	0,74	>25	0,46
32	NA	NA	NA

NA = данные отсутствуют. Все соединения показали отсутствие токсичности вплоть до наивысшей тестируемой концентрации. Все соединения показали отсутствие активности (LEC>25 мкМ) в анализе обратного скрининга на НЕК 293 NF-кВ, описанном выше.

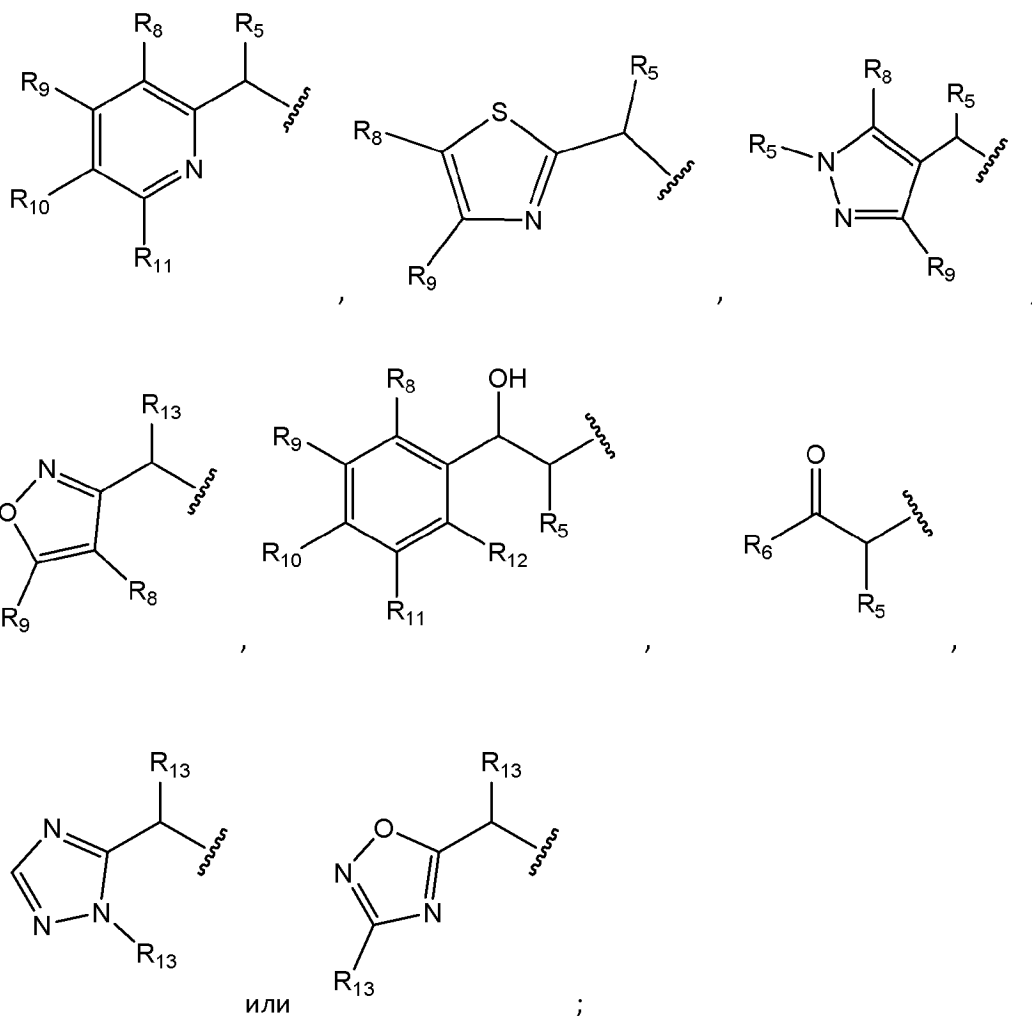
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I),



или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф, где

R₁ представляет собой любую из следующих структур:



R₂ представляет собой водород, -O-(C₁₋₃)-алкил, галоген, (C₁₋₃)-алкил, -O-(C₁₋₃)-алкил-O-(C₁₋₃)-алкил или CH₂OH;

R₃ представляет собой водород, -O-(C₁₋₃)-алкил, галоген, (C₁₋₃)-алкил или -C(=O)-R₇, где R₇ представляет собой -O-(C₁₋₃)-

алкил, NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{N}(\text{CH}_3)(\text{C}_{1-3})$ -алкил, $\text{N}((\text{C}_{1-3})\text{-алкил})_2$ или пирролидин;

R_4 представляет собой водород или фтор;

R_5 представляет собой (C_{1-3}) -алкил, (C_{1-3}) -фтор-алкил или CH_2OH ;

R_6 представляет собой NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$ или $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, (гетеро)-анилины, необязательно замещенные одним или несколькими из R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} или R_{12} , или (гетеро)-бензиламины, необязательно замещенные одним или несколькими из R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} или R_{12} ,

каждый из R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} и R_{12} , которые являются одинаковыми или различными, независимо выбран из водорода, (C_{1-3}) -алкила, $-\text{O}-(\text{C}_{1-3})$ -алкила или галогена

и

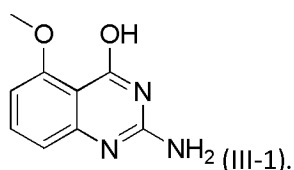
R_{13} представляет собой водород, (C_{1-3}) -алкил или (C_{1-3}) -фтор-алкил.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф по п.1 вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

3. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф по п.1 или фармацевтическая композиция по п.2 для применения в качестве лекарственного средства.

4. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф по п.1 или фармацевтическая композиция по п.2 для применения при лечении нарушения, в которое вовлечена модуляция TLR7 и/или TLR8.

5. Замещенный 2-амино-4-гидроксихиназолин, характеризующийся следующей формулой



По доверенности