

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037103

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.05

(21) Номер заявки
201990833

(22) Дата подачи заявки
2017.09.28

(51) Int. Cl. C07D 401/14 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИДИНА, ОБЛАДАЮЩИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ
ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ RET КИНАЗЫ

(31) 2016-191725

(56) WO-A1-2015031613

(32) 2016.09.29

(33) JP

(43) 2019.10.31

(86) PCT/GB2017/052913

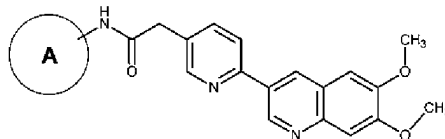
(87) WO 2018/060714 2018.04.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДАЙТИ САНКИО КОМПАНИ,
ЛИМИТЕД (JP)

(72) Изобретатель:
Инагаки Хироаки, Сибата Йосихиро,
Намики Хиденори, Кагедзи Хидеаки,
Накаяма Кийоси, Канета Ясуюки (JP)

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

(57) Настоящее изобретение относится к соединению, обладающему ингибирующим действием в отношении RET киназы, или его фармацевтически приемлемой соли, применяемому при лечении заболеваний, таких как рак. В частности, в изобретении соединение определяется как соединение, представленное следующей общей формулой (I) (формула 1):



(I)

или как его фармацевтически приемлемая соль.

B1

037103

037103

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединению или его соли, которое обладает избирательной ингибирующей активностью в отношении RET киназы, PDGFR киназы, KIT киназы, NTRK киназы, FLT3 киназы и других подобных киназ и может применяться для лечения рака

Настоящее изобретение относится к профилактическому средству и/или терапевтическому средству при раке легкого, раке щитовидной железы, раке молочной железы, раке толстой кишки, саркоме, лейкозе, и других типах рака, которое включает в качестве активного ингредиента упомянутое выше соединение или его соль.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции для предотвращения или лечения упомянутых выше заболеваний, которая включает в качестве активного ингредиента упомянутое выше соединение или его соль, к применению упомянутого выше соединения для приготовления лекарственного препарата для предотвращения или лечения упомянутых выше заболеваний или к способу предотвращения или лечения упомянутых выше заболеваний, который включает введение фармакологически эффективного количества упомянутого выше соединения млекопитающему (предпочтительно человеку).

Уровень техники

RET киназа, PDGFR (рецептора фактора роста тромбоцитов) киназа, KIT (рецептора фактора стволовых клеток) киназа, NTRK (рецептора нейротрофического фактора) киназа, FLT3 киназа и другие подобные киназы все являются рецепторными тирозинкиназами. Эти киназы имеют структуру, которая проникает через клеточную мембрану, и имеют сайт связывания с фактором роста снаружи клетки и тирозинкиназный активный центр внутри клетки. Эти рецепторные тирозинкиназы конвертируют стимуляцию в результате воздействия фактора роста извне клетки (= связывание с сайтом связывания фактора роста) в сигналы в внутри клетки (= фосфорилирование находящегося ниже по ходу транскрипции белка) и играют определенную роль в процессе роста, деления, дифференцировки и морфогенеза клеток). Считают, что активирующая мутация (в том числе точечная мутация, делеционная мутация, инсерционная мутация, рекомбинантная мутация и другие подобные мутации) или повышенная экспрессия этих киназ являются причиной развития большого разнообразия типов рака, саркомы, лейкоза и других подобных онкологических заболеваний, и поэтому можно предположить, что применение ингибиторов этих киназ будет эффективным при лечении рака, саркомы, лейкоза и других онкологических заболеваний (непатентные публикации 1-5 и патентная публикация 1).

В частности, что касается RET киназы, то ее активирующая мутация была обнаружена у некоторых пациентов с раком легкого, с раком щитовидной железы и другими типами рака (непатентные публикации 6-8), и у этих пациентов не обнаруживают других мутаций. Следовательно, можно считать, что мутировавшая RET-киназа является мутацией, запускающей развитие этих видов рака. То есть, другими словами, считают, что, если у пациента точно обнаружена мутация RET-киназы и пациенту вводят ингибитор RET киназы, имеющий достаточную ингибирующую активность, то с высокой степенью вероятности рак можно излечить. Недавно было высказано предположение, что активирующая мутация RET киназы является причиной развития не только рака легкого и рака щитовидной железы, но и некоторых типов рака молочной железы и рака толстой кишки (непатентные публикации 9-11).

Вплоть до настоящего времени, для лечения пациентов с RET-мутированным раком применяются лекарственные средства, обладающие ингибирующей активностью в отношении RET киназы, такие как кабозантиниб, вандетаниб и ленватиниб, но терапевтическое действие таких лекарственных средств является слабым и на их применение накладывается ряд ограничений (непатентная публикация 12). Считается, что такое слабое терапевтическое действие этих лекарственных средств обусловлено их низкой ингибирующей активностью в отношении RET киназы и токсичностью (непатентная публикация 13), такой как гипертензия, в результате ингибирования KDR киназы (называемой также VEGFR2 киназой) (непатентная публикация 14).

Кроме того, ранее описанные в литературе ингибирующие RET киназу соединения, в том числе упомянутые выше существующие лекарственные средства, имеют низкую ингибирующую активность в отношении киназы с мутировавшим геном-привратника, которая является типичным представителем мутантной киназы, резистентной к ингибиторам киназы (непатентная публикация 15), и, поэтому, даже, если такое соединение применяют при лечении, то рак вырабатывает резистентность к соединению на ранней стадии, в результате чего рак становится неизлечимым.

До настоящего времени сообщалось о нескольких ингибиторах RET (патентные публикации 1 и 2). Однако эти ингибиторы RET имеют ряд серьезных недостатков, связанных с низкой ингибирующей активностью в отношении RET киназы, высокой ингибирующей активностью в отношении KDR киназы, с невозможностью применения в случае RET киназы с мутировавшим геном-привратником и с другими проблемами.

Список цитируемых публикаций

Патентные публикации.

Патентная публикация 1 International Publication No. WO 2015/031613

Патентная публикация 2 International Publication No. WO 2015/079251

Непатентные публикации.

Непатентная публикация 1 Levitzki, A. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2004, 15 (4), pp. 229-235.

Непатентная публикация 2 George, D. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532, pp. 141-151.

Непатентная публикация 3 Ashman, J. K. and Griffith, R. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2013, 22 (1), pp. 103-115.

Непатентная публикация 4 Wang, T. et al. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2009, 19 (3), pp 305-319.

Непатентная публикация 5 Heinrich, M. C. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2004, 4 (3), pp. 255-271.

Непатентная публикация 6 Kohno, T. et al. Nature Medicine, 2012, 18 (3), pp. 375-377.

Непатентная публикация 7 Matsubara, D. et al. Journal of Thoracic Oncology, 2012, 7 (12), pp. 1872-1876.

Непатентная публикация 8 Agrawal, N. et al. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2013, 98 (2), E364-E369.

Непатентная публикация 9 Mulligan, J. M. Nature Reviews Cancer, 2014, 14 (3), pp. 173-186.

Непатентная публикация 10 Le Rolle, A. F. et al. Oncotarget, 2015, 6 (30), pp. 28929-28937.

Непатентная публикация 11 Medico, E. et al. Nature Communications, 2015, 6, Article No. 7002.

Непатентная публикация 12 Phay, J. E. and Shah, M. H. Clinical Cancer Research, 2010, 16(24), pp. 5936-5941.

Непатентная публикация 13 Hayman, S. R. et al. Current Oncology Reports, 2012, 14 (4), pp. 285-294.

Непатентная публикация 14 Sherman, S. I. Oral Oncology, 2013, 49, pp. 707-710.

Непатентная публикация 15 Kodama, T. et al. Molecular Cancer Therapeutics, 2014, 13, pp. 2910-2918.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагается терапевтическое средство, например противораковое средство, для различных типов рака, саркомы, лейкоза и других подобных онкологических заболеваний, вызываемых активирующей мутацией или повышенной экспрессией киназы, где эти заболевания вызваны RET киназой и существующие ингибиторы характеризуются недостаточным терапевтическим воздействием на эти заболевания.

Авторы настоящего изобретения предположили, что, если создать лекарственное средство, которое являлось бы более сильнодействующим и имело более высокую киназную селективность, чем существующие лекарственные средства, и/или применить его для лечения заболеваний, вызываемых активирующей мутацией или повышенной экспрессией киназы, такой как RET киназа, при которых существующие ингибиторы оказывают недостаточное терапевтическое действие, наряду с киназами, активирующая мутация или повышенная экспрессия которых вызывает развитие различных типов рака, саркомы,

мы, лейкоза и других подобных онкологических заболеваний, то это лекарственное средство позволит достигать высокого терапевтического воздействия на эти заболевания, и поэтому авторы изобретения провели глубокое исследование по созданию такого лекарственного средства.

В связи с этим авторы настоящего изобретения обнаружили, что упомянутое далее соединение, представленное формулой (I), проявляет высокую и селективную ингибирующую активность в отношении киназ, таких как RET, PDGFR, KIT, NTRK и FLT3, а также проявляет высокую ингибирующую активность в отношении мутантов их генов-привратников. Кроме того, авторы изобретения также обнаружили, что, так как это соединение проявляет слабую ингибирующую активность в отношении KDR киназы, которая, по-видимому, проявляет токсичность, когда она ингибирована, и характеризуется высокой киназной селективностью, то это соединение может применяться в качестве лекарственного препарата.

То есть, другими словами, авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединение, представленное формулой (I), может применяться в качестве лекарственного препарата, который является безопасным и может применяться в качестве профилактического/терапевтического средства при различных типах рака, или при таких связанных с раком патологических состояниях или заболеваниях, при которых обнаруживается активирующая мутация киназ, таких как RET, PDGFR, KIT, NTRK и FLT3, или присутствует повышенная экспрессия этих киназ. На основе этих выводов авторами изобретения и было создано настоящее изобретение.

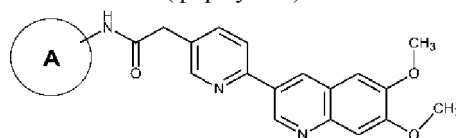
Соединение по настоящему изобретению обладает чрезвычайно высоким и селективным ингибирующим действием, в частности в отношении RET киназы, и может применяться в качестве терапевтического средства для различных типов рака (в частности, рак легкого, рака щитовидной железы и других подобных онкологических заболеваний).

Кроме того, так как соединение по настоящему изобретению имеет в его структуре атом (атомы) азота в ароматическом кольце, проявляющий слабую основность, это соединение обладает высокой растворимостью в воде, особенно в кислой среде, по сравнению с нейтральными соединениями, такими как соединения, описанные в патентной публикации International Publication No WO 2015/031613. Кроме того, так как за счет использования атомов азота ароматического кольца могут быть образованы хорошо растворимые в воде соли упомянутого выше соединения, то можно ожидать, что соединение будет иметь высокую пероральную всасываемость и может применяться в качестве чрезвычайно эффективного лекарственного препарата.

Настоящее изобретение относится к следующим пунктам (1)-(17).

(1) Соединение, представленное следующей общей формулой (I):

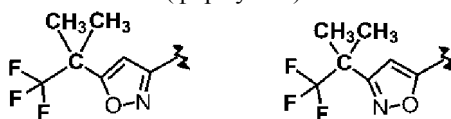
(формула 1)



(I)

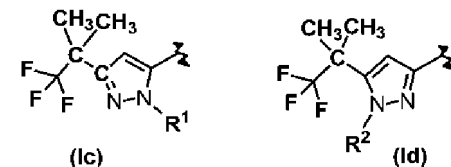
где А представляет собой фрагмент, выбранный из следующих формул (Ia)-(Id):

(формула 2)



(Ia)

(Ib)



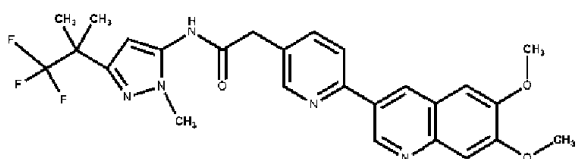
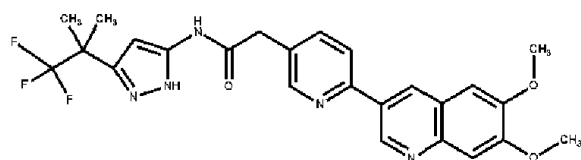
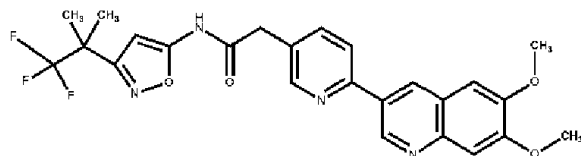
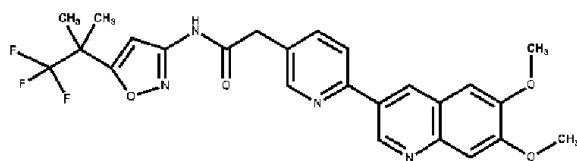
(Ic)

(Id)

где R¹ представляет атом водорода или C₁-C₃-алкильную группу и R² представляет атом водорода или C₁-C₃-алкильную группу, или его фармацевтически приемлемая соль.

(2) Одно, или два, или более соединений, выбранные из соединений, представленных следующими структурными формулами:

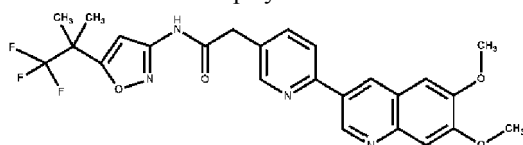
(формула 3)



(3) 2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-3-ил]ацетамид,

(3-1) соединение, имеющее следующую структурную формулу, или его фармацевтически приемлемая соль.

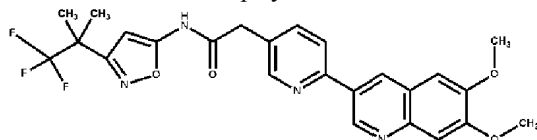
Формула 4.



(4) 2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид,

(4-1) соединение, имеющее следующую структурную формулу, или его фармацевтически приемлемая соль.

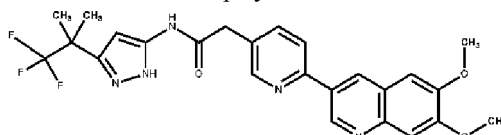
Формула 5.



(5) 2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]ацетамид,

(5-1) соединение, имеющее следующую структурную формулу, или его фармацевтически приемлемая соль.

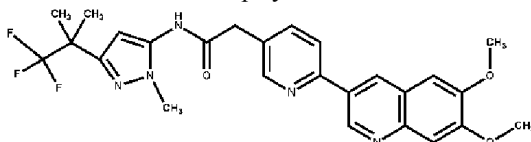
Формула 6.



(6) 2-[6-(6,7-Диметоксифуран-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[1-метил-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пирозол-5-ил]ацетамид,

(6-1) соединение, имеющее следующую структурную формулу, или его фармацевтически приемлемая соль.

Формула 7.



(7) Фармацевтически приемлемая соль соединения по любому одному из приведенных выше пунктов (2)-(6).

(8) Метансульфонатная соль соединения по любому одному из приведенных выше пунктов (2)-(6).

(9) Ингибитор RET киназы, включающий в качестве активного ингредиента соединение по любому одному из приведенных выше пунктов (1)-(8) или его фармацевтически приемлемую соль.

(10) Лекарственный препарат, включающий, в качестве активного ингредиента, соединение по любому одному из приведенных выше пунктов (1)-(8) или его фармацевтически приемлемую соль.

(11) Лекарственный препарат по пункту 10 для лечения заболевания, вызванного активирующей мутацией или повышенной экспрессией RET киназы, при этом заболевание связано с активирующей мутацией RET киназы или заболевание сопровождается активирующей мутацией RET киназы.

(12) Лекарственный препарат по приведенному выше пункту (10) для применения для предотвращения или лечения рака.

(12-1) Лекарственный препарат по приведенному выше пункту (10) для применения для лечения рака.

(13) Лекарственный препарат по приведенному выше пункту (10) для применения для лечения рака, вызванного активирующей мутацией или повышенной экспрессией RET киназы.

(14) Лекарственный препарат по приведенному выше пункту (10) для применения для лечения рака легкого, рака щитовидной железы, рака молочной железы или рака толстой кишки.

(15) Применение соединения по любому одному из приведенных выше пунктов (1)-(8) или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления фармацевтической композиции.

(16) Способ лечения или предотвращения рака, включающий введение фармакологически эффективного количества соединения по любому одному из приведенных выше пунктов (1)-(8) или его фармацевтически приемлемой соли теплокровному животному.

(17) Соединение по любому одному из приведенных выше пунктов (1)-(8) или его фармацевтически приемлемая для применения в способе лечения или предотвращения заболевания.

В настоящем изобретении, "C₁-C₃-алкильная группа" обозначает линейную или разветвленную алкильную группу, имеющую от 1 до 3 углеродных атомов, и примеры C₁-C₃-алкильной группы могут включать метильную, этильную, n-пропильную или изопропильную группу. В R¹ и R² предпочтительно, чтобы C₁-C₃-алкильная группа представляла собой метильную группу. В R² предпочтительно, чтобы C₁-C₃-алкильная группа представляла собой метильную группу или этильную группу.

В настоящем изобретении, "атом галогена" обозначает атом фтора, атом хлора, атом брома или атом йода. В X¹, X², X³ и X⁴ предпочтительно, чтобы атом галогена представлял собой атом хлора или атом брома.

В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы "одновалентный металл" представлял собой литий, натрий или калий.

В настоящем изобретении, когда настоящее соединение имеет группу с основными свойствами, такую как аминогруппа, оно может быть превращено в соль путем проведения реакции с кислотой, или, когда настоящее соединение имеет группу с кислотными свойствами, такую как карбоксильная группа, оно может быть превращено в соль путем проведения реакции с основанием. Соответственно "фармацевтически приемлемая соль" обозначает образованную таким образом соль.

Предпочтительные примеры солей на основе группы с основными свойствами включают гидрогалогениды, такие как гидрофторид, гидрохлорид, гидробромид и гидройодид, соли неорганических кислот, такие как нитрат, перхлорат, сульфат и фосфат; низшие алкансульфонаты, такие как метансульфонат, трифторметансульфонат и этансульфонат, арилсульфонаты, такие как бензолсульфонат и п-толуолсульфонат, соли органических кислот, такие как ацетат, малат, фумарат, сукцинат, адипат, цитрат, аскорбат, тартрат, оксалат и малеат; соли аминокислот, такие как соль глицина, соль лизина, соль арги-

нина, соль орнитина, глутамат и аспаратат. Предпочтительно, чтобы соли на основе группы с основными свойствами представляли собой гидрогалогениды или соли неорганических кислот.

С другой стороны, предпочтительные примеры солей на основе группы с кислотными свойствами могут включать соли щелочных металлов, такие как соль натрия, соль калия и соль лития, соли щелочно-земельных металлов, такие как соль кальция и соль магния, соли металлов, такие как соль алюминия и соль железа; соли аминов, в том числе неорганические соли, такие как соль аммония, и органические соли, такие как соль третбутиламина, соль третоксиламина, соль диизопропиламина, соль дибензиламина, соль морфолина, соль глюкозамина, соль фенилглициналкилового эфира, соль этилендиамин, соль N-метилглюкамина, соль гуанидина, соль диэтиламина, соль триэтиламина, соль дициклогексиламина, соль N,N'-дибензилэтилендиамин, соль хлорпрокаина, соль прокаина, соль диэтаноламина, соль N-бензилфенетиламина, соль пипаразина, соль тетраметиламмония и соль трис(гидроксиметил)аминометана; и соли аминокислот, такие как соль глицина, соль лизина, соль аргинина, соль орнитина, глутамат и аспаратат. Более предпочтительные примеры могут включать соль магния, соль кальция, соль диизопропиламина и соль третбутиламина, и особенно предпочтительным примером может являться соль третбутиламина.

Соединение, представленное общей формулой (I), по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль включает все изомеры (кето-енольные изомеры, стереоизомеры и другие изомеры).

Когда соединение, представленное общей формулой (I), по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль имеет в молекуле асимметрический углеродный атом, оно имеет различные изомеры. В случае соединения по настоящему изобретению все эти изомеры и смеси этих изомеров представлены одной формулой, а именно, общей формулой (I). Поэтому настоящее изобретение включает все эти изомеры и смеси, включающие эти изомеры при любом заданном соотношении.

Описанный выше стереоизомер может быть получен, если это требуется, путем выделения синтезированного соединения по настоящему изобретению с использованием обычного метода оптического разделения или метода разделения.

Соединение, представленное общей формулой (I), по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль может содержать отличное от природного соотношение атомных изотопов в одном или более атомов, образующих такое соединение. Примеры таких атомных изотопов могут включать дейтерий (^2H), тритий (^3H), йод-125 (^{125}I), углерод-13 (^{13}C) и углерод-14 (^{14}C). Кроме того, описанное выше соединение может быть помечено радиоизотопом, таким как тритий (^3H), йод-125 (^{125}I) или углерод-14 (^{14}C). Меченое радиоактивным изотопом соединение может применяться в качестве терапевтического или профилактического средства, реагента для проведения научных исследований, такого как реагент для проведения анализа, и диагностического средства, такого как *in vivo* диагностическое визуализирующее средство. Все изотопные формы соединения по настоящему изобретению входят в объем настоящего изобретения, вне зависимости от того, являются ли они радиоактивными или нерадиоактивными.

Когда соединение, представленное общей формулой (I), по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль оставляют на воздухе или подвергают перекристаллизации, оно абсорбирует воду, или к нему присоединяется адсорбированная вода, или в ряде случаев оно становится гидратом. Такой гидрат также входит в определение соли по настоящему изобретению.

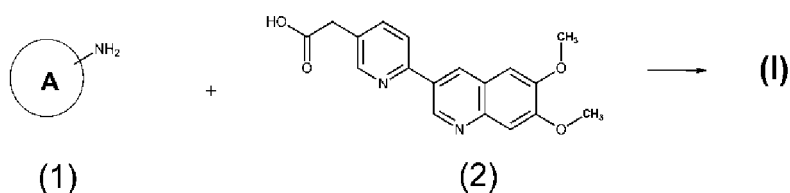
Соединение, представленное общей формулой (I), по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль иногда абсорбирует другой конкретный тип растворителя и в результате становится сольватом. Такой сольват также входит в определение соли по настоящему изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение включает все соединения, которые метаболизируются *in vivo* и превращаются в описанные выше соединения пиридина, представленные общей формулой (I), или их соли.

Далее ниже будут описаны типичные методы получения соединения, представленного общей формулой (I). Соединение по настоящему изобретению может быть получено различными методами, и приведенные далее методы получения являются только примерами, и их не следует считать в качестве ограничений для настоящего изобретения. Следует иметь в виду, что в процессе проведения реакции в случае необходимости заместители могут быть защищены с помощью подходящих защитных групп и что на тип такой защитной группы не накладываются конкретные ограничения. Выпускаемые промышленностью исходные материалы и реагенты использовали без дополнительной очистки, если не указано иначе.

Метод А. Описанное выше соединение, представленное общей формулой (I), может быть синтезировано путем проведения реакции конденсации соединения амина (1) с соединением карбоновой кислоты (2), как показано на приведенной ниже схеме 1.

Схема 1.
Формула 8:

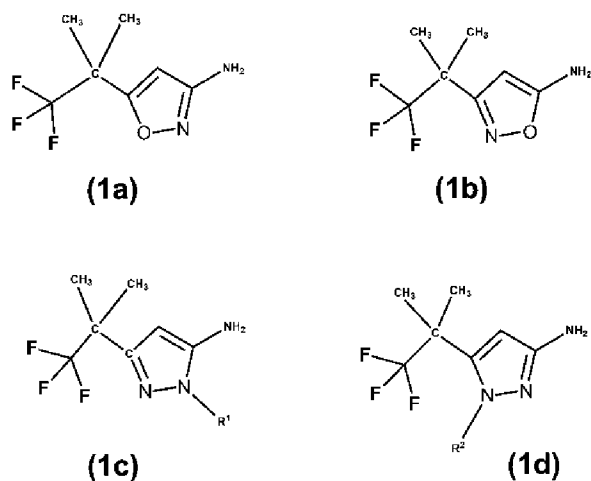


где А определен выше.

(А-1) Соединение амина (1).

В качестве соединения амина (1), применяемого в настоящей реакции, могут быть использованы соединения (1a)-(1d). Соединения (1a) и (1b) могут быть синтезированы в соответствии с методом, описанным в публикации J. Med. Chem., 2012, 55, 1082-1105. Соединения амина (1c) и (1d) могут быть синтезированы в соответствии с методом, описанным для второй стадии в примере 42, раздел 155 патентной публикации WO 2014/141187.

Формула 9:



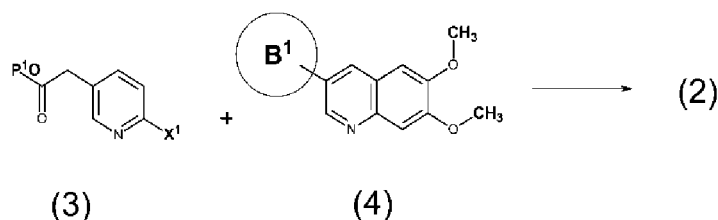
где R¹ и R² определены выше.

(А-2) Соединение карбоновой кислоты (2).

(А-2-1) Метод получения 1 соединения карбоновой кислоты (2).

Схема 2.

Формула 10:



где R¹ представляет атом водорода или защитную группу для карбоновой кислоты, B¹ представляет бороновую кислоту, эфир бороновой кислоты, пинаколат бороновой кислоты, трифторборат калия, циклический триолборат или боронат N-метилиминодиуксусной кислоты (MIDA), X¹ представляет атом галогена.

Соединение карбоновой кислоты (2) может быть синтезировано, например, путем проведения реакции сочетания Сузуки, используя производное 2-галогенпиридинуксусной кислоты (3) и производного хиолин-3-бороновой кислоты (4), как показано выше в формуле (2). Когда R¹ представляет собой защитную группу для карбоновой кислоты, после завершения реакции сочетания Сузуки полученное вещество подвергают реакции удаления защитной группы, такой как реакция гидролиза, в результате проведения которой получают соединение карбоновой кислоты (2).

Что касается защитной группы для карбоновой кислоты, то подходящие защитные группы описаны в монографии Peter G.M. Wuts, Theodora W. Greene, Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, 4th edition, Wiley-Interscience, 2006 и в других подобных публикациях. Предпочтительно, чтобы защитная группа R¹ представляла собой метильную группу, этильную группу или третбутильную группу. Что касается реакции удаления защитной группы, то подходящие условия проведения реакции могут быть подобраны в зависимости от типа используемой защитной группы, используя монографию Peter G.M. Wuts, Theodora W. Greene, Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, 4th edition, Wiley-Interscience, 2006 и

другие подобные публикации.

(А-2-1-1) Метод получения производного 2-галогенпиридин-уксусной кислоты (3).

Что касается производного 2-галогенпиридина (3), применяемого в настоящем изобретении в качестве исходного материала, то может быть использовано соединение, производимое промышленностью, или оно может быть синтезировано известным методом. В качестве варианта вместо производного 2-галогенпиридина (3) могут быть использованы производное 2-(трифторметансульфонилокси)пиридина или производные 2-(замещенный сульфонилокси)пиридина, такие как производное 2-(п-толуолсульфонилокси)пиридина и производное 2-(метансульфонилокси)пиридина.

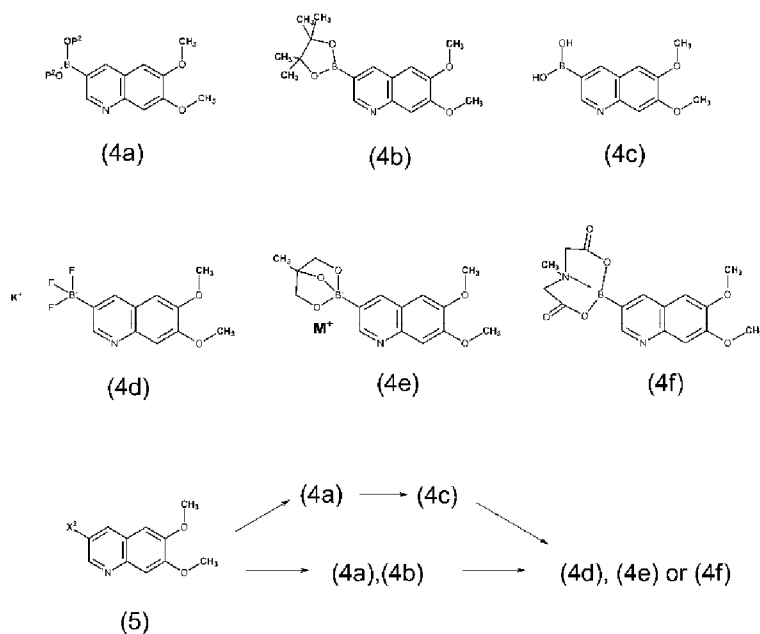
Предпочтительные примеры производного 2-галогенпиридина (3) включают 2-хлорпиридин-5-илуксусную кислоту, метил 2-хлорпиридин-5-ил ацетат, этил 2-хлорпиридин-5-ил ацетат и третбутил 2-хлорпиридин-5-ил ацетат.

(А-2-1-2) Метод получения производного хинолин-3-бороновой кислоты (4).

Примеры производного хинолин-3-бороновой кислоты (4) могут включать соединения (4a)-(4f), изображенные на приведенной ниже схеме 3, но этим примеры не ограничиваются.

Схема 3.

Формула 11:



где P² представляет C₁-C₃-алкильную группу, X² представляет атом галогена и М представляет одновалентный металл.

Производные хинолин-3-бороновой кислоты (4a), (4b) и (4c) могут быть синтезированы из 3-галогенхинолина (5), изображенного выше в формуле 3. Например, n-бутиллитий подвергают взаимодействию с 3-галогенхинолином (5), который может быть синтезирован известным методом, с получением производного 3-литохинолина, и затем триалкилборат, такой как триизопропилборат, подвергают взаимодействию с производным 3-литохинолина с получением производного эфира хинолин-3-бороновой кислоты (4a). Кроме того, производное эфира хинолин-3-бороновой кислоты (4a) гидролизуют с получением производного хинолин-3-бороновой кислоты (4c). Или же бис(пинаколато)дифтор подвергают взаимодействию с 3-галогенхинолином (5) в присутствии палладиевого катализатора, в результате чего 3-галогенхинолин (5) может быть превращен в производное эфира хинолин-3-бороновой кислоты (4b).

Кроме того, вместо производного хинолин-3-бороновой кислоты (4c) или производных эфира хинолин-3-бороновой кислоты (4a) и (4b) могут быть также использованы трифторборат калия (4d), циклический триолборат (4e) или MIDA боронат (4f). Трифторборат калия (4d), циклический триолборат (4e) или MIDA боронат (4f) могут быть синтезированы путем использования в качестве исходных материалов производного хинолин-3-бороновой кислоты (4c) или производных эфира хинолин-3-бороновой кислоты (4a) и (4b) известным методом.

После завершения синтеза производные хинолин-3-бороновой кислоты (4a)-(4f) могут быть выделены, или они могут быть непосредственно подвергнуты реакции сочетания Сузуки без проведения их выделения и очистки.

(А-2-1-3) Реакция сочетания Сузуки производного 2-галогенпиридинуксусной кислоты (3) с производным хинолин-3-бороновой кислоты (4).

В настоящей реакции может быть использован палладийсодержащий катализатор. Примеры катализатора, который может быть использован в изобретении, включают тетра-

кис(трифенилфосфин)палладий(0), бис[трис(2-метилфенил)-фосфин]палладий(0), бис(третретибутилфосфин)палладий(0), бис(трициклогексилфосфин)палладий(0), бис(трифенилфосфин)-палладия(II) дихлорид, [1,1'-бис(дифенил-фосфино)ферроцен]-дихлорпалладий(II), дихлорбис(три-о-толил-фосфин)палладий(II), дихлорбис(трициклогексилфосфин)палладий(II), дихлор[2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил]палладий(II), дихлор[9,9-диметил-4,5-бис(дифенилфосфино)ксантен]палладий(II), [1,3-бис(2,6-диизопропилфенил)имидазол-2-илиден](3-хлорпиридил)-палладия(II) дихлорид (PEPSI (зарегистрированный товарный знак)-IPr катализатор), хлор(2-дициклогексилфосфино-2',6'-диметокси-1,1'-бифенил)[2-(2-аминоэтил)фенил]палладий(II) (SPhos Pd G1), хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)-[2-(2-аминоэтил)фенил]палладий(II) (XPhos Pd G1), хлор(трифенилфосфин) [2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II), хлор[три(о-толил)фосфин][2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II), хлор[(трициклогексилфосфин)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II) (PCy3 Pd G2), хлор[(третретибутилфосфин)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II) (P(tBu)₃ Pd G2), хлор(2-дициклогексил-фосфино-2',6'-диметокси-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)] палладий (II) (SPhos Pd G2), хлор(2-дициклогексил-фосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]-палладий(II) (XPhos Pd G2), [2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил][2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия(II) метансульфонат (rac-BINAP Pd G3), (2-дициклогексилфосфино-2',6'-диметокси-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия(II) метансульфонат (SPhos Pd G3), [(4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия(II) метансульфонат (XantPhos Pd G3), (2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)-[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]-палладия(II) метансульфонат (XPhos Pd G3), палладия(II) ацетат, трис(добензилиденацетон)дипалладий(0) и палладий на угле.

Вместе с описанным выше палладиевым катализатором при необходимости может быть подобран и использован лиганд. Примеры лиганда могут включать трифенилфосфин, три(о-толил)фосфин, три(третретибутил)фосфин, три(циклогексил)фосфин, 1,1'-бис(дифенилфосфино) ферроцен (DPPF), 1,2-бис(дифенилфосфино)этан (DPPE), 2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафталин (rac-BINAP), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (XantPhos), 2-дициклогексил-фосфино-2',6'-диметоксибифенил (SPhos), и 2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенил (XPhos).

В случае необходимости при проведении реакции может быть использовано основание. Примеры основания, которое может быть использовано в изобретении, включают гидрокарбонат натрия, гидрокарбонат калия, карбонат натрия, карбонат калия, карбонат цезия, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид таллия, фосфат калия, фторид цезия, третбутоксид калия, триэтиламин и диизопропилэтиламин, но эти примеры не ограничиваются.

С целью ускорения реакции и предотвращения образования побочных продуктов в соответствующих случаях в реакционную систему могут быть введены добавки. Например, когда в качестве исходного материала используют соединение на основе трифлата, может быть добавлен хлорид лития, и также для предотвращения образования побочных продуктов может быть добавлен формиат калия или другое подобное соединение.

В настоящей реакции предпочтительно использовать систему с водным растворителем. Однако настоящая реакция может быть проведена также без использования воды. Примеры растворителя могут включать спирта, такие как метанол, этанол, 1-пропанол, 2-пропанол и 1-бутанол, эфиры, такие как тетрагидрофуран, 2-метилтетрагидрофуран и 1,4-диоксан, другие растворители, такие как N,N-диметилформамид, N,N-диметилацетамид, N-метилпирролидон, диметилсульфоксид, толуол, бензол, ацетонитрил, дихлорметан, 1,2-дихлорэтан, хлороформ и этилацетат, и смешанный растворитель из упомянутого выше растворителя и воды. Типы используемых растворителей не ограничиваются упомянутыми выше растворителями.

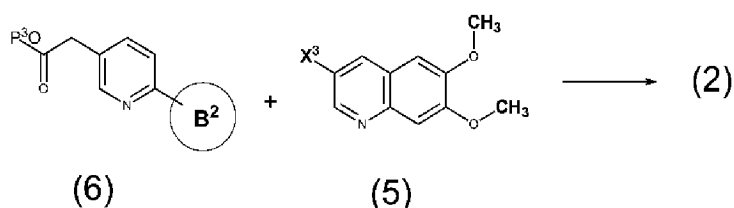
Что касается температуры проведения реакции, то реакция может быть проведена при подходящей температуре, зависящей от используемых реакционного субстрата и реагента. Реакция может быть проведена при температуре от комнатной температуры до 180°C, более предпочтительно при температуре от 60 до 140°C.

Что касается времени проведения реакции, то реакция может быть проведена в течение подходящего периода времени, зависящего от используемых реакционного субстрата и реагента. Время проведения реакции предпочтительно составляет от 30 мин до 6 ч.

(A-2-2) Метод получения 2 соединения карбоновой кислоты (2).

Соединения карбоновой кислоты (2) может быть также синтезировано путем проведения реакции сочетания Сузуки производного пиридин-2-бороновой кислоты (6) с 3-галогенхинолином (5), как изображено ниже на схеме 4,

Схема 4.
Формула 12:



где B^2 представляет бороновую кислоту, эфир бороновой кислоты, пинаколат бороновой кислоты, трифторборат калия, циклический триолборат или MIDA боронат, P^3 представляет атом водорода или защитную группу для карбоновой кислоты, X^3 представляет атом галогена.

В настоящей реакции фрагмент бороновой кислоты в производном пиридин-2-бороновой кислоты (6) может представлять собой бороновую кислоту, эфир бороновой кислоты, пинаколат бороновой кислоты, трифторборат калия, циклический триолборат или MIDA боронат, как и в случае с производным хинолин-3-бороновой кислоты (4) в описанном выше методе (A-2-1), и, кроме того, могут быть использованы те же реакционные условия, которые используют в описанном выше методе (A-2-1).

Такое производное бороновой кислоты может быть синтезировано, например, из производимого промышленностью производного 2-галогенпиридина (3) в соответствии с методом, использующимся для получения производного хинолин-3-бороновой кислоты (4), который описан выше в методе (A-2-1).

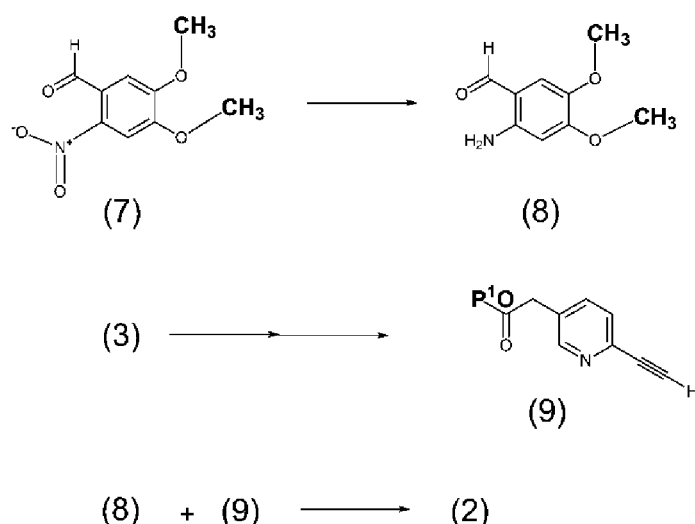
Что касается защитной группы для карбоновой кислоты P^3 , то реакция установления защитной группы и реакция удаления защитной группы могут быть проведены таким же методом, как описанный выше метод в (A-2-1).

Реакция сочетания производного пиридин-2-бороновой кислоты (6) с 3-галогенхинолином (5) не ограничивается описанной выше реакцией сочетания Сузуки, и могут быть также использованы другие различные реакции кросс-сочетания. Например, могут быть использованы реакция кросс-сочетания с применением органического соединения цинка вместо производного бороновой кислоты (реакция Негishi) или реакция кросс-сочетания с применением органического соединения олова (реакция Стилла).

Реакция удаления защитной группы для карбоновой кислоты может быть проведена таким же методом, как описанный выше метод в (A-2-1).

(A-2-3) Метод получения 3 соединения карбоновой кислоты (2) Соединения карбоновой кислоты (2) может быть также синтезировано методом, показанном ниже на схеме 5. Конкретно соединения карбоновой кислоты (2) может быть синтезировано путем образования хинолинового кольца в результате реакции между производным аминокальдегида (8) и производным ацетиленом (9).

Схема 5.
Формула 13:



где P^1 определен выше.

Что касается защитной группы для карбоновой кислоты P^1 , то реакция установления защитной группы и реакция удаления защитной группы могут быть проведены таким же методом, как описанный выше метод в (A-2-1).

(A-2-3-1) Синтез производного аминокальдегида (8).

Производное аминокальдегида (8) может быть синтезировано, например, из производного нитроальдегида (7) или другого подобного соединения известным методом. Из производного нитроальдегида (7), производное аминокальдегида (8) может быть синтезировано широко известным методом восстановления нитрогруппы. Примеры метода восстановления могут включать каталитическое гидрирование, метод

использования порошка железа в присутствии кислоты, такой как хлористоводородная кислота или уксусная кислота, и метод использования хлорида олова(II).

(А-2-3-2) Синтез производного ацетилена (9).

Производное ацетилена (9) может быть синтезировано путем проведения реакции сочетания Соногашира между производным 2-галогенпиридина (3) или другим подобным соединением и моносиллазащищенным ацетиленом с последующим удалением из продукта реакции силильной группы.

В настоящей реакции предпочтительно использовать в качестве катализатора соль меди(I). Примеры соли меди(I) могут включать галогениды меди, такие как йодид меди(I) и бромид меди(I), но типы используемых медных катализаторов этим не ограничиваются.

В настоящей реакции, как правило, предпочтительно использовать палладиевый катализатор. Примеры палладиевого катализатора могут включать тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0) и бис(трифенилфосфин)палладия(II) дихлорид, но типы используемых палладиевых катализаторов этим не ограничиваются.

В настоящей реакции предпочтительно использовать основание. Примеры основания могут включать триэтиламин, диизопропилэтиламин, диэтиламин, дициклогексиламин и третбутиламин, но типы используемых оснований этим не ограничиваются.

В настоящей реакции предпочтительно использовать растворитель. На тип используемого растворителя не накладывают конкретных ограничений при условии, что он отрицательно не влияет на протекание реакции. Примеры растворителя могут включать эфиры, такие как тетрагидрофуран и 1,4-диоксан, и различные растворители, такие как N,N-диметилформамид, N,N-диметилацетамид, N-метилпирролидон, диметилсульфоксид, толуол, бензол, ацетонитрил, дихлорметан, 1,2-дихлорэтан, хлороформ и этилацетат, но типы используемых растворителей этим не ограничиваются.

Что касается температуры реакции, то реакция может быть проведена при подходящей температуре, зависящей от используемых реакционного субстрата и реагента. Реакция может быть проведена при температуре от комнатной температуры до 180°C, и более предпочтительно при температуре от 40 до 120°C.

Что касается времени проведения реакции, то реакция может быть проведена в течение подходящего периода времени, зависящего от используемых реакционного субстрата и реагента. Время проведения реакции предпочтительно составляет от 30 мин до 6 ч.

Используемое в настоящей реакции производное 2-галогенпиридина (3) может быть синтезировано известным методом. Кроме того, вместо производного 2-галогенпиридина (3) могут быть также использованы производное 2-(трифторметансульфонилокси)-пиридина или производные 2-(замещенный сульфонилокси)пиридина, такие как производное 2-(п-толуолсульфонилокси)пиридина и производное 2-(метансульфонилокси)пиридина.

Примеры моносиллазамещенного ацетилена, который может быть использован в настоящей реакции, могут включать, но этим не ограничивая, триметилсилацетилен, триэтилсилацетилен, триизопропилсилацетилен, третбутилдиметилсилацетилен и третбутилдифенилсилацетилен. Более того, вместо моносиллазамещенного ацетилена может быть также использован соответственно монозащищенный ацетилен. В этом случае необходимо, чтобы после завершения реакции Соногаширы можно было удалить защиту с используемого монозащищенного ацетилена без повреждения других структур, для того чтобы его можно было использовать в последующей реакции.

В последующей реакции удаления защиты могут быть применены хорошо известные условия проведения реакции, зависящие от типа используемого моносиллазащищенного ацетилена или других монозащищенных ацетиленов. Например, может быть применен метод, описанный в монографии Peter G.M. Wuts, Theodora W. Greene, Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, 4th edition, Wiley-Interscience, 2006 и в других подобных публикациях. В случае использования моносиллазащищенного ацетилена, может быть использован, например, тетра-н-бутиламмония фторид или другие подобные соединения. В качестве растворителя могут быть использованы, например, эфиры, такие как тетрагидрофуран. Кроме того, в реакционную систему могут быть также введены добавки, такие как вода или уксусная кислота.

(А-2-3-3) Метод получения соединения карбоновой кислоты (2) с использованием производного аминокальдегида (8) и производного ацетилена (9).

Настоящая реакция может быть проведена, например, в присутствии трифлата серебра(I) и анилина. Используемые в изобретении реагенты и их комбинация этим не ограничиваются.

Примеры растворителя, который может быть использован в настоящей реакции, могут включать, но этим не ограничивая, дихлорметан, 1,2-дихлорэтан и хлороформ.

Что касается температуры проведения реакции, то реакция может быть проведена при температуре от комнатной температуры до 180°C, и более предпочтительно при температуре от 60 до 140°C.

Что касается времени проведения реакции, то реакция может быть проведена в течение подходящего периода времени, зависящего от используемых реакционного субстрата и реагента. Время проведения реакции предпочтительно составляет от 30 мин до 6 ч.

Реакция удаления защитной группы для карбоксильной группы может быть проведена таким же

методом, как описанный выше метод в (А-2-1).

(А-3) Реакция конденсации соединения амина (1) с соединением карбоновой кислоты (2).

Примеры конденсирующего реагента, который может быть использован в настоящей реакции, могут включать, но этим не ограничивая, дициклогексилкарбодиимид (DCC), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) и его гидрохлорид, бензотриазол-1-илокситрис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBOP), O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (HATU), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU), бис(2-оксо-3-оксазолидинил)фосфорноватистой кислоты хлорид (BOP-Cl), 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфония хлорид (DMT-MM), {{{(1-циано-2-этокси-2-оксоэтилиден)амино}окси}-4-морфолино-метилен} диметиламмония гексафторфосфат (COMU), пропилфосфоновый ангидрид (ТЗР), N,N'-карбонилдимидазол (CDI) и дифенилфосфорил-азид (DPPA). Предпочтительно, чтобы конденсирующим реагентом являлся пропилфосфоновый ангидрид (ТЗР).

В случае использования конденсирующего реагента, такого как дициклогексилкарбодиимид (DCC), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) или его гидрохлорид, могут быть добавлены 1-гидроксибензотриазол (HOBT), 1-гидрокси-7-азабензотриазол (HOAt) или другие подобные соединения.

Кроме того, при необходимости, может быть добавлено основание, такое как триэтиламин, диизопропилэтиламин, пиридин, 2,6-дитрет-бутилпиридин, 2,6-лутидин, коллидин, 2,6-дитретбутил-4-метилпиридин, 4-диметиламинопиридин или имидазол. Однако типы используемых в изобретении оснований этим не ограничиваются.

Примеры реакционного растворителя, который может быть использован в изобретении, могут включать, но этим не ограничивая, тетрагидрофуран, 1,4-диоксан, 1,2-диметоксизтан, N,N-диметилформамид, N,N-диметилацетамид, N-метилпирролидон, ацетонитрил, дихлорметан, 1,2-дихлорэтан, хлороформ и толуол. Предпочтительно, чтобы реакционным растворителем являлся N,N-диметилформамид, N,N-диметилацетамид или N-метилпирролидон.

Что касается температуры реакции, то реакция может быть проведена при подходящей температуре, зависящей от используемых реакционного субстрата и реагента. Реакция может быть проведена при температуре от -20 до 120°C, и более предпочтительно при температуре от -5 до 70°C.

Что касается времени проведения реакции, то реакция может быть проведена в течение подходящего периода времени, зависящего от используемых реакционного субстрата и реагента. Время проведения реакции предпочтительно составляет от 30 мин до 6 ч.

(А-4) Метод синтеза соединения (I), используя промежуточное соединение, полученное превращением соединения карбоновой кислоты (2) в галогенангидрид.

Соединение (I) может быть также синтезировано путем превращения соединения карбоновой кислоты (2) в галогенангидрид и затем конденсации галогенангидрида с амином (1). При необходимости галогенангидрид может быть выделен. Примеры галогенангидрида, который может быть использован в изобретении, могут включать фторангидрид, хлорангидрид и бромангидрид.

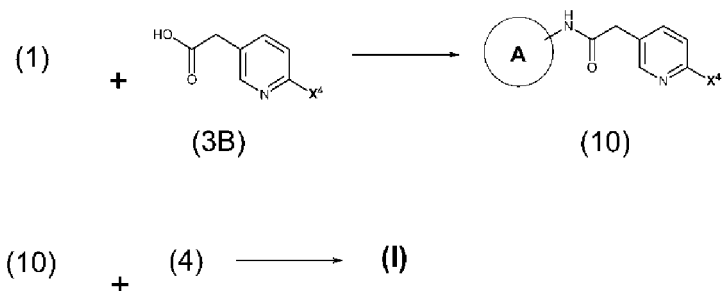
В качестве варианта соединения (I) может быть также синтезировано путем превращения карбоновой кислоты (2) в симметричный ангидрид кислоты или смешанный ангидрид кислоты, и затем конденсации его с амином (1). При необходимости симметричный ангидрид кислоты или смешанный ангидрид кислоты могут быть выделены. В качестве смешанного ангидрида кислоты может быть использован смешанный ангидрид кислоты, полученный в результате реакции карбоновой кислоты (2) с этилхлорформиатом, изобутилхлорформиатом, третбутилхлорформиатом, хлорангидридом триметилуксусной кислоты и другими подобными соединениями.

Метод В.

(В-1) Соединение (I) может быть также получено путем образования амидной связи в результате проведения реакции конденсации соединения амина (1) с соединением карбоновой кислоты (3В) и затем проведения реакции кросс-сочетания.

Схема 8.

Формула 14:



где X⁴ представляет атом галогена.

В применяемых в изобретении реакции конденсации и реакции кросс-сочетания могут использо-

ваться такие же условия, как описанные выше условия в случае (A-2).

В каждой из приведенных выше формул, когда R¹ и R² каждый представляет атом водорода, может быть использовано исходное соединение, в котором атом азота защищен защитной группой. В таком случае после завершения реакции конденсации, изображенной на формуле 1, защитную группу удаляют для превращения продукта реакции в соединение (I). Следует отметить, что защитные группы и их введение и удаление подробно описаны в монографии Peter G.M. Wuts, Theodora W. Greene, *Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis*, 4th edition, Wiley-Interscience, 2006, и других подобных публикациях.

После завершения описанной выше реакции на каждой стадии, требуемое соединение извлекают из реакционной смеси обычным методом. Например, реакционную смесь нейтрализуют в соответствующих случаях, или, когда присутствуют нерастворимые вещества, такие нерастворимые вещества удаляют фильтрацией и затем к остатку добавляют воду и несмешивающийся органический растворитель, такой как этилацетат, для того, чтобы отделить органический слой, содержащий требуемое соединения. Затем органический слой промывают водой или другим подобным растворителем и затем сушат над безводным сульфатом натрия или другим подобным веществом, и затем растворитель отгоняют с получением требуемого соединения. Кроме того, требуемое соединение может быть также получено путем извлечения нерастворимых веществ, образовавшихся в реакционном растворе, фильтрацией, или путем добавления воды или органического растворителя к реакционному раствору и затем извлечения образовавшихся нерастворимых веществ фильтрацией.

При необходимости полученный требуемый продукт может быть отделен и очищен путем использования соответствующей комбинации известных методов, таких как перекристаллизация или переосаждение, или метода, обычно используемого для разделения и очистки органических соединений, например метода с использованием синтетических адсорбентов, такого как адсорбционная колоночная хроматография или распределительная колоночная хроматография, метода с использованием ионообменной хроматографии или колоночной хроматографии с нормальной/обращенной фазой на силикагеле или алкилированном силикагеле и затем элюирования с помощью соответствующего элюента.

Кроме того, при необходимости оптически активное соединение может быть отделено и/или очищено путем использования хиральной колонки.

Активность ингибирующего действия соединения по настоящему изобретению в отношении RET киназы и RET киназы с мутацией гена-привратника может быть измерена с помощью метода оценки активности киназы, который обычно используется специалистами в этой области. Такое ингибирующее действие может быть измерено, например, методом анализа сдвига электрофоретической подвижности. В качестве варианта ингибирующее действие может быть измерено методом иммунологического анализа с использованием набора AlphaLISA, методом вестерн-блоттинга или методом иммуноферментного анализа ELISA. Кроме того, с помощью методов, аналогичных описанным выше методам, может быть также измерено не только ингибирующее действие настоящего соединения в отношении RET киназы, но также ингибирующее действие настоящего соединения в отношении других киназ, таких как PDGFR, KIT, NTRK и FLT3, и ингибирующее действие настоящего соединения в отношении KDR киназы, характеризующие селективность.

Селективность соединения по настоящему изобретению в отношении других киназ может быть также подтверждена упомянутым выше методом анализа сдвига электрофоретической подвижности и другими подобными методами. Например, метод, который основан на сдвиге электрофоретической подвижности, предлагаемый фирмой Cerna Biosciences, Inc., или метод KinomeScan, предлагаемый фирмой DiscoverX, применяется для панели киназ, состоящей из различных типов киназ, в результате чего может быть измерена ингибирующая активность соединения в отношении различных типов киназ и может быть подтверждена его киназная селективность.

Активность ингибирующего действия соединения по настоящему изобретению в отношении RET киназы, RET киназы с мутацией гена-привратника и KDR киназы, которая проявляется в клетках, может быть измерена с помощью метода оценки активности киназы, который обычно используется специалистами в этой области. Например, ингибирующее действие может быть измерено методом иммунологического анализа с использованием набора AlphaLISA, методом вестерн-блоттинга или методом иммуноферментного анализа ELISA. Кроме того, с помощью методов, аналогичных описанным выше методам, может быть также измерено не только ингибирующее действие настоящего соединения в отношении RET киназы и KDR киназы, но также ингибирующее действие в отношении других киназ, таких как PDGFR, KIT, NTRK и FLT3.

Ингибирующее действие соединения по настоящему изобретению в отношении роста клеток линии LC-2/ad немелкоклеточного рака легкого и клеток линии TT рака щитовидной железы может быть измерено с помощью испытания на ингибирование роста, которое обычно используют специалисты в этой области. Например, ингибирующее действие может быть измерено с помощью набора для исследования жизнеспособности клеток ATP-Glo или набора MTT. Ингибирующее действие настоящего соединения в отношении роста других клеточных линий может быть также измерено упомянутыми выше методами.

Кроме того, может быть исследована *in vivo* противоопухолевая активность соединения по настоящему изобретению путем проведения противоопухолевого испытания, которое обычно используют спе-

циалисты в этой области. Например, в случае упомянутого выше испытания различные типы опухолевых клеток трансплантируют мыши, крысе или другому подобному животному, и одновременно с трансплантацией или после того, как подтверждена адгезия трансплантированных клеток, субъекту вводят перорально, внутривенно или другим способом соединение по настоящему изобретению. Для подтверждения *in vivo* противоопухолевой активности настоящего соединения через промежуток времени от нескольких дней до нескольких недель после введения, рост опухоли в группе животных, не подвергавшихся лечению, сравнивают с ростом опухоли в группе животных, которым вводили соединение.

Растворимость в воде соединения по настоящему изобретению может быть определена, например, путем добавления настоящего соединения в исследуемую среду, перемешивания полученной смеси, отстаивания реакционной смеси в течение некоторого времени, ее фильтрации и определения концентрации соединения в фильтрате. В качестве используемой в изобретении среды могут быть использованы буферные растворы, имеющие различные значения pH, и среда, которая имитирует кишечный сок при приеме пищи или натощак.

Способность соединения по настоящему изобретению проникать в различные ткани и/или органы, например способность проникать в головной мозг, в центральную нервную систему и в кожу, может быть измерена путем введения соединения различным типам животных, удаления у животных тканей или органов, после того как пройдет определенный период времени, их обработки соответствующим образом, определения концентрации соединения, содержащегося в них и затем сравнения измеренной концентрации соединения с его концентрацией в крови. Может существовать случай, когда способность к проникновению может быть измерена более точно или может быть измерена неинвазивно путем введения животному флуоресцентно-меченого или меченого радиоактивным изотопом соединения.

Описанное выше соединение пиридина, представленное общей формулой (I), по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль могут применяться в качестве содержащего их лекарственного препарата, и предпочтительно в качестве противоракового препарата. Примеры заболевания, для лечения или предотвращения которого может применяться соединение по настоящему изобретению, может включать различные типы рака, саркомы и лейкоза, в том числе типы рака, такие как рак коры надпочечников, рак анального отверстия, рак желчного протока, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, саркома Юинга, рак желчного пузыря, гипофарингеальный рак, фарингеальный рак, рак губы и полости рта, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, меланому, мезотелиому, множественную миелому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак желудка, рак яичка и рак щитовидной железы; лейкоз, такой как хронический лимфолейкоз, острый лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз и острый миелогенный лейкоз; и лимфому, такую как лимфома Ходжкина и не-ходжкинская лимфома.

Описанное выше соединение пиридина, представленное общей формулой (I), по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вводят в различных формах. На лекарственную форму соединения пиридина не накладывают конкретных ограничений и ее определяют в зависимости от различных типов составов, возраста, пола и других показателей пациента, тяжести заболевания и других подобных параметров. Например, когда настоящее соединение или его фармацевтически приемлемая соль находится в лекарственной форме, такой как таблетка, пилюля, порошок, гранула, сироп, жидкость, суспензия, эмульсия или капсула, ее вводят перорально. С другой стороны, когда настоящее соединение или его фармацевтически приемлемая соль находится в лекарственной форме, такой как инъекция, ее вводят внутривенно, в качестве единственного препарата, или в смеси с обычным восстановителем потери жидкости, таким как глюкоза или аминокислота. Кроме того, при необходимости, такую инъекционную форму вводят в качестве единственного препарата внутримышечно, внутривожно, подкожно или интраперитонеально. В случае суппозитория, его вводят ректально. Предпочтительным методом введения является пероральное введение.

Различные типы этих препаратов могут быть приготовлены путем добавления к основному лекарственному средству известным методом известных вспомогательных веществ, которые обычно используют при приготовлении фармацевтических препаратов, таких как вспомогательное вещество, связующие, разрыхлитель, смазывающее вещество, растворяющее вещество, улучшающие вкус и запах вещества и вещество для образования слоя покрытия.

Когда настоящее соединение или фармацевтически приемлемую соль прессуют в таблетку, могут широко использоваться носители, которые являются общепринятыми в данной области. Примеры носителя могут включать вспомогательные вещества, такие как лактоза, сахароза, хлорид натрия, глюкоза, мочевины, крахмал, карбонат кальция, каолин, кристаллическая целлюлоза и кремниевая кислота; связующие, такие как вода, этанол, пропанол, сахарный сироп, раствор глюкозы, раствор крахмала, раствор желатина, карбоксиметилцеллюлоза, шеллак, метилцеллюлоза, фосфат калия и поливинилпирролидон; разрыхлители, такие как сухой крахмал, альгинат натрия, порошок агара, порошок ламинарина, гидрокарбонат натрия, карбонат кальция, эфиры жирных кислот с полиоксиэтиленсорбитаном, лаурилсульфат натрия, моноглицерида стеарат, крахмал и лактоза; замедлители дезинтеграции, такие как сахароза, стеарин, масло какао и гидрированное масло; усилители всасывания, такие как четвертичное аммониевое основание и лаурилсульфат натрия; увлажнители, такие как глицерин и крахмал; адсорбенты, такие как

крахмал, лактоза, каолин, бентонит и коллоидная кремниевая кислота; и смазывающие вещества, такие как очищенный тальк, стеарат, порошок буры и полиэтиленгликоль. Кроме того, при необходимости таблетка может быть дополнительно подвергнута обработке с целью получения таблетки с нанесенным на нее слоем покрытия, такой как таблетка с сахарной оболочкой, таблетка с желатиновой оболочкой, таблетка с энтеросолюбильным покрытием, таблетка с пленочным покрытием, или, кроме того, таблетка с двойным слоем покрытия или таблетка с многослойным покрытием.

Когда настоящее соединение или фармацевтически приемлемую соль формуют в пилюлю, могут широко использоваться носители, которые являются общепринятыми в данной области. Примеры носителя могут включать вспомогательные вещества, такие как глюкоза, лактоза, крахмал, масло какао, гидрированное растительное масло, каолин и тальк; связующие, такие как порошок аравийской камеди, порошок трагакантовой камеди, желатин и этанол; и разрыхлители, такие как порошок ламинарина.

Когда настоящее соединение или фармацевтически приемлемую соль формуют в суппозиторий, могут широко использоваться носители, которые являются общепринятыми в данной области. Примеры носителя могут включать полиэтиленгликоль, масло какао, высший спирт, эфиры высших спиртов, желатин и полусинтетический глицерид.

Когда настоящее соединение или фармацевтически приемлемую соль приготавливают в инъекционной форме, предпочтительно, чтобы жидкая форма и суспензионная форма была стерилизованной и изотонической по отношению к крови или другой подобной жидкости организма. Когда настоящее соединение или его соль приготавливают в виде такой жидкой, эмульсионной и суспензионной формы, могут быть использованы все разбавители, которые обычно используют в данной области. Примеры разбавителя могут включать воду, этиловый спирт, пропиленгликоль, этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксилированный изостеариловый спирт и эфиры жирных кислот с полиоксиэтиленсорбитаном. В этом случае фармацевтический препарат может содержать хлорид натрия, глюкозу или глицерин в количестве, достаточном для приготовления изотонического раствора, и, кроме того, к фармацевтическому препарату могут быть также добавлены обычный солубилизатор, буфер, успокаивающее средство и другие подробные вещества.

И кроме того, при необходимости фармацевтический препарат может содержать окрашивающее вещество, консервант, ароматизатор, вкусовое вещество, подсластитель, другие подобные вещества и другие фармацевтические продукты.

На количество активного ингредиента, то есть соединения по изобретению, содержащегося в описанном выше фармацевтическом препарате, не накладывают конкретных ограничений, и его в соответствующих случаях выбирают из широкого диапазона значений. Как правило, достаточно, чтобы содержание активного ингредиента составляло от 1 до 70 мас.%, и предпочтительно от 1 до 30 мас.% в расчете на массу всей композиции.

Доза может различаться в зависимости от симптомов, возраста, массы тела, способа введения, лекарственной формы и других подобных параметров. Обычно нижний предел суточной дозы для взрослого пациента составляет 0,001 мг/кг (предпочтительно 0,01 мг/кг, более предпочтительно 0,1 мг/кг), и верхний предел суточной дозы составляет 200 мг/кг (предпочтительно 20 мг/кг, более предпочтительно 10 мг/кг). Соединение по настоящему изобретению может быть введено при описанной выше дозе один раз или разделено на несколько введений в сутки.

Соединение по настоящему изобретению может применяться в комбинации с различными терапевтическими или профилактическими средствами для упомянутых выше заболеваний, в случае которых, как считается в настоящем изобретении, они будут эффективными. Например, соединение по настоящему изобретению может применяться в комбинации с так называемыми противораковыми химиотерапевтическими средствами, такими как алкилирующие средства (циклофосфамид, бендамустин, темозоломид, митомицин С и другие подобные средства), препараты платины (цисплатин, карбоплатин и другие подобные средства), антиметаболиты (пеметрексед, 5-FU, капецитабин и другие подобные средства), ингибиторы тубулина (винкристин, таксол, эрибулин и другие подобные средства) и ингибиторы топоизомеразы (иринотекан, доксорубицин и другие подобные средства) и с их препаратами, имеющими различные формы. Кроме того, соединение по настоящему изобретению может применяться в комбинации с различными типами так называемых биофармацевтических препаратов, включающих препараты антител, такие как трастузумаб, бевацизумаб и ниволумаб, комплексы антитело-лекарственное средство, такие как T-DM1 и другие подобные препараты. Кроме того, настоящее соединение может также применяться в комбинации с различными типами так называемых низкомолекулярных таргетных средств, таких как ингибиторы киназы (иматиниб, нилотиниб, эрлотиниб, gefитиниб, афатиниб, осимертиниб, сунитиниб, дазатиниб, ибрутиниб, сорафениб, вемурафениб, траметиниб и палбоциклиб), ингибиторы протеасомы (бортезомиб и другие подобные препараты), ингибиторы HDAC (вориностат и другие подобные препараты) и ингибиторы PARP (олапариб и другие подобные препараты). В дополнение к упомянутым выше средствам настоящее соединение может также применяться в комбинации с иммуномодуляторами, такими как талидомид, интерфероны, и с лекарственными средствами для гормональной терапии (тамоксифен, анастрозол и другие подобные препараты). Кроме того, эти лекарственные средства объединяют друг с другом, в результате чего настоящее соединение может применяться в комбинации с тремя или

более лекарственными средствами.

Полезные эффекты изобретения

Согласно настоящему изобретению предлагается соединение, представленное описанной выше формулой (I), которое обладает ингибирующим действием в отношении RET киназы. Такое соединение может применяться в качестве терапевтического средства при заболевании, вызванном активирующей мутацией или повышенной экспрессией RET киназы, при заболевании, связанном с активирующей мутацией или повышенной экспрессией RET киназы, и/или заболеванием, при котором присутствует активирующая мутация или повышенная экспрессия RET киназы, например в качестве противоракового средства.

Подробное описание

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно в приведенных примерах и другим подобным образом. Однако эти примеры не ограничивают объем настоящего изобретения, и их не следует рассматривать в качестве ограничений ни с какой точки зрения. Кроме того, используемые в настоящем изобретении реагенты, растворители и исходные материалы являются легко доступными и могут быть приобретены у фирм-поставщиков, если не указано иначе.

Протонный ЯМР регистрировали на 400 МГц ЯМР спектрометре фирмы JEOL или на 400 МГц ЯМР спектрометре фирмы Varian. Спектральные данные протонного ЯМР характеризуют значимые пики, и данные представлены в виде химического сдвига (который измеряется в ppm (δ) относительно пика тетраметилсилана), числом протонов и мультиплетностью расщепления пика (которая представлена как с: синглет; д: дуплет; т: триплет; кв: квартет; м: мультиплет; уш.с: уширенный синглет; дд: двойной дуплет, и так далее), и, кроме того, константа взаимодействия обозначается величиной J (единицы: Гц), если она может быть однозначно описана. Данные масс-спектрального анализа низкого разрешения представлены относительно максимального пика ионизации (почти во всех случаях соответствующего максимальному пику УФ поглощения), полученного после пропускания через колонку системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (система Agilent; колонка: Develosil Combi-RP-5, 2,0×50 мм, Cadenza CD-18, 3,0×75 мм, или ZORBAXSB-C18, 2,1×50 мм; растворитель: содержащий 0,1% муравьиной кислоты ацетонитрил/вода, или содержащий 0,01% трифторуксусной кислоты ацетонитрил/вода), с применением метода электрораспылительной ионизации (ESI) или метода химической ионизации при атмосферном давлении (APCI).

Колоночную хроматографию на силикагеле проводили с применением выпускаемой промышленностью заполненной силикагелем колонки и автоматической системы (например, системы Biotage SP1 System и другой подобной системы) или методом, включающим заполнение стеклянной колонки силикагелем марки Silica Gel 60 фирмы Merck (диаметр частиц: 0,063-0,200 мм), и были просто описаны множество типов используемых растворителей. Количества используемых растворителей, соотношение растворителей, хронометраж замены одного растворителя на другой и метод градиента в изобретении не описываются. Однако считается, что применяемые в изобретении методы очистки и/или разделения могут быть легко воспроизведены на основе обычных знаний и/или обычной технологии в области химического синтеза.

Следует отметить, что используемые в приведенных далее примерах условные сокращенные обозначения имеют следующие значения:

мг: миллиграмм,
г: грамм,
мл: миллилитр и
МГц: мегагерц.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен результат регресса опухоли в испытании противоопухолевой активности с использованием модели ксенотрансплантата, созданной с помощью клеток линии LC-2/ad немелкоклеточного рака легкого.

На фиг. 2 представлен результат уменьшения RET фосфорилирования тирозина в положении 905, который используется в качестве индикатора активности RET киназы.

Примеры

Пример 1.

2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-3-ил]ацетамид.

1-1. (6,7-Диметоксихинолин-3-ил)бороновая кислота.

В атмосфере азота раствор 3-бром-6,7-диметоксихинолина (17,03 г, 63,5 ммоль) и триизопропилбората (19,0 мл, 82,3 ммоль) в тетрагидрофуране (170 мл) охлаждали до -78°C и добавляли по каплям к раствору н-бутиллития в гексане (1,60 моль/л, 58,0 мл, 92,8 ммоль) в течение 1 ч. Затем смешанный раствор перемешивали в течение 30 мин при указанной выше температуре. Затем, температуру реакционного раствора повышали до температуры от -30 до -40°C, к реакционному раствору медленно добавляли 1 моль/л хлористоводородной кислоты (170 мл), и температуру раствора затем повышали до комнатной температуры. К реакционному раствору добавляли водный раствор 1 моль/л гидроксида натрия (50 мл), и осажден-

ное твердое вещество собирали фильтрацией. Полученное твердое вещество растворяли в метаноле и затем концентрировали при пониженном давлении. После чего к остатку добавляли смешанный растворитель хлороформ/метанол (9:1), и нерастворимые вещества затем отфильтровывали. Органический слой отделяли от полученного фильтрата, содержащего воду, и водный слой затем насыщали хлоридом натрия, затем экстрагировали смешанным растворителем хлороформ/метанол (9:1) три раза. Полученные органические слои объединяли, и объединенный слой сушили над безводным сульфатом натрия, затем фильтровали, и затем концентрировали при пониженном давлении с получением целевого соединения (13,74 г, 59,0 ммоль, выход: 72%) в виде оранжевого твердого вещества. MS m/z: 234 (M+H)⁺.

1-2. Метил [6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридил-3-ил]-ацетат.

Раствор карбоната натрия (5,96 г, 56,2 ммоль) в воде (18 мл) добавляли к суспензии (6,7-диметоксихинолин-3-ил)бороновой кислоты (4,37 г, 18,75 ммоль), метил 2-(6-хлорпиридил-3-ил)ацетата (3,47 г, 18,70 ммоль) и 2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенила (895 мг, 1,88 ммоль) в 1,4-диоксане (72 мл), после чего вытесняли азот. Затем к реакционной смеси добавляли трис(дибензилиденацетон)-дипалладий(0) (849 мг, 0,938 ммоль), и затем снова проводили вытеснение азота. Смесь перемешивали при 80°C в течение 3 ч. Затем, реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли к реакционному раствору насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия (200 мл). Смешанный раствор экстрагировали этилацетатом три раза, и объединенный органический слой затем сушили над безводным сульфатом натрия. Полученное вещество концентрировали при пониженном давлении и затем очищали колоночной хроматографией на силикагеле (NH силикагель, этилацетат/гексан) с получением целевого соединения (4,04 г, 12,46 ммоль, выход 67%) в виде желтого твердого вещества. ¹H-ЯМР(CDCl₃) δ: 3,71 (2H, c), 3,74 (3H, c), 4,03 (3H, c), 4,06 (3H, c), 7,14 (1H, c), 7,46 (1H, c), 7,77 (1H, дд, J=8,2, 2,1 Гц), 7,84 (1H, д, J=7,3 Гц), 8,62 (1H, д, J=1,8 Гц), 8,64 (1H, д, J=1,8 Гц), 9,31 (1H, д, J=2,4 Гц). MS m/z: 339 (M+H)⁺.

1-3. 2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридил-3-ил]уксусная кислота.

Тетрагидрофуран (20 мл), метанол (20 мл) и водный раствор 1 моль/л гидроксида натрия (20 мл, 20,0 ммоль) добавляли к метил 2-[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]ацетату (2,24 г, 6,91 ммоль), и полученную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Затем к реакционному раствору добавляли 1 моль/л хлористоводородной кислоты (20 мл) и смешанный раствор затем концентрировали при пониженном давлении. К полученному остатку добавляли смешанный растворитель хлороформ/метанол (9:1), затем фильтровали. Полученный фильтрат концентрировали при пониженном давлении и затем сушили с получением недостаточно очищенного продукта целевого соединения. Полученный недостаточно очищенный продукт промывали диэтиловым эфиром и затем смешанным растворителем этанол/диэтиловый эфир (1:1) с получением целевого соединения (1,57 г, 4,83 ммоль, выход: 70%) в виде бесцветного твердого вещества. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆): 3,69 (2H, c), 3,91 (3H, c), 3,93 (3H, c), 7,40 (1H, c), 7,45 (1H, c), 7,81 (1H, дд, J=8,2, 2,1 Гц), 8,06 (1H, д, J=8,5 Гц), 8,58 (1H, д, J=1,8 Гц), 8,81 (1H, д, J=1,8 Гц), 9,35 (1H, д, J=1,8 Гц). MS m/z: 325 (M+H)⁺.

1-4. 2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-3-ил]ацетамид.

Пропилфосфоновый ангидрид (50% раствор в этилацетате, приблизительно 1,7 моль/л, 1,80 мл, 3,06 ммоль) добавляли к суспензии 2-[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]уксусной кислоты (486 мг, 1,495 ммоль), 5-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-3-амин (320 мг, 1,648 ммоль, описанного в публикации J. Med. Chem., 2012, 55, 1082-1105) и пиридина (0,483 мл, 5,97 ммоль) в N, N-диметилформамиде (12 мл), и полученную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь выливали в смесь воды (90 мл) и насыщенного водного раствора гидрокарбоната натрия (60 мл), и полученную смесь затем охлаждали до 0°C. Осажденное твердое вещество собирали фильтрацией, и к полученному твердому веществу добавляли воду и насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия. Полученный раствор экстрагировали дихлорметаном. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол) с получением целевого соединения (654 мг, 1,308 ммоль, выход: 87%) в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 2.

2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-3-ил]ацетамида метан-сульфонат.

Водный раствор 2,0 моль/л метансульфоновой кислоты (0,821 мл, 1,642 ммоль) добавляли к суспензии 2-[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-3-ил]ацетамида (632 мг, 1,261 ммоль) в изопропиловом спирте (12,6 мл) при комнатной температуре, и полученную смесь затем перемешивали в течение 30 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C и перемешивали в течение 1 ч. Затем образовавшееся твердое вещество собирали фильтрацией. Полученное твердое вещество промывали изопропиловым спиртом и затем сушили с получением целевого соединения (734 мг, 1,230 ммоль, выход: 98%) в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 3.

2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид.

Пропилфосфоновый ангидрид (50% раствор в этилацетате, приблизительно 1,7 моль/л, 1,80 мл, 3,06 ммоль) добавляли к суспензии 2-[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]уксусной кислоты (486 мг, 1,495 ммоль), полученной в примере 1-3, 3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-амина (320 мг, 1,648 ммоль, описанного в публикации J. Med. Chem., 2012, 55, 1082-1105) и пиридина (0,483 мл, 5,97 ммоль) в N,N-диметилформамиде (12 мл) при комнатной температуре, полученную смесь затем перемешивали при указанной выше температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь выливали в смесь воды (80 мл) и насыщенного водного раствора гидрокарбоната натрия (80 мл) и полученную смесь затем охлаждали до 0°C. Осажденное твердое вещество собирали фильтрацией, и затем к полученному твердому веществу последовательно добавляли дихлорметан, воду и насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия, после чего органический слой отделяли. Полученный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол) с получением целевого соединения (683 мг, 1,366 ммоль, выход: 91%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Пример 4.

2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамида метан-сульфонат.

Водный раствор 2,0 моль/л метансульфоновой кислоты (0,883 мл, 1,766 ммоль) добавляли к суспензии 2-[6-(6,7-диметокси-хинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамида (680 мг, 1,360 ммоль) в изопропиловом спирте (20,4 мл) при комнатной температуре, и полученную смесь перемешивали при указанной выше температуре в течение 30 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C и перемешивали в течение 1 ч. Образовавшееся твердое вещество собирали фильтрацией. Полученное твердое вещество промывали изопропиловым спиртом и затем сушили с получением целевого соединения (626 мг, 1,050 ммоль, выход: 77%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Пример 5.

2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]ацетамид

5-1. Третбутил 5-амино-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-1-карбоксилат

Раствор гидроксида калия (7,0 г, 125 ммоль) в воде (15 мл) добавляли к раствору 3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-5-амина (2,6 г, 13,5 ммоль, соединение, синтезированное на второй стадии в примере 42 в разделе 155 патентной публикации WO 2014/141187) и дихлорметане (100 мл) при комнатной температуре, и затем полученную смесь интенсивно перемешивали при указанной выше температуре. К этому реакционному раствору добавляли дитретбутилдикарбонат (3,0 г, 13,8 ммоль) при комнатной температуре, и полученный таким образом раствор перемешивали при указанной выше температуре в течение 4 ч. Отделенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и затем сушили над сульфатом натрия. Нерастворимые вещества удаляли фильтрацией, и растворитель затем отгоняли при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/дихлорметан) с получением названного соединения (2,2 г, 7,5 ммоль, выход: 56%) в виде светло-желтого твердого вещества. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 1,49 (6H, c), 1,64 (9H, c), 5,15 (2H, уш.с), 5,46-5,47 (1H, м). MS m/z: 194 (M+H-Вос) $^+$.

5-2. Третбутил 5-({6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил}ацетил)амино-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-1-карбоксилат.

Пропилфосфоновый ангидрид (50% раствор в этилацетате, приблизительно 1,7 моль/л, 46,0 мл, 78,2 ммоль) добавляли к раствору третбутил 5-амино-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразоле-1-карбоксилата (8,10 г, 27,6 ммоль), 2-[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]уксусной кислоты (8,5 г, 26,2 ммоль) полученной в примере 1-2, и пиридина (21 мл, 261 ммоль) в N,N-диметилформамиде (80 мл) при комнатной температуре, и полученную смесь затем перемешивали при указанной выше температуре в течение 5 ч. Затем, реакционную смесь выливали в смесь воды (200 мл) и насыщенного водного раствора гидрокарбоната натрия (100 мл), и полученную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем осажденное твердое вещество собирали фильтрацией. Полученное твердое вещество промывали водой и затем гексаном и затем сушили при пониженном давлении. Полученный таким образом неочищенный продукт суспендировали в диизопропиловом эфире (200 мл), и нерастворимые вещества собирали фильтрацией с получением целевого соединения (15,21 г, 25,4 ммоль, выход: 97%) в виде почти бесцветного твердого вещества. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 1,51 (6H, c), 1,61 (9H, c), 3,83 (2H, c), 4,04 (3H, c), 4,07 (3H, c), 6,91 (1H, c), 7,16 (1H, c), 7,47 (1H, c), 7,83-7,90 (2H, м), 8,63 (1H, д, J=2,4 Гц), 8,70 (1H, д, J=1,8 Гц), 9,32 (1H, д, J=1,8 Гц), 10,34 (1H, c). MS m/z: 600 (M+H) $^+$.

5-3. 2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-

пиразол-5-ил]ацетамид.

Трифторуксусную кислоту (5,0 мл) добавляли к раствору третбутил 5-({[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-ацетил}амино)-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-1-карбоксилата (0,81 г, 1,351 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при охлаждении льдом, и температуру полученной смеси повышали до комнатной температуры, затем смесь перемешивали. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч, и летучие компоненты затем отгоняли при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (NH силикагель, дихлорметан/этилацетат, и затем дихлорметан/метанол). Полученный неочищенный продукт промывали смешанным растворителем этилацетат/гексан с получением названного соединения (0,64 г, 1,283 ммоль, выход: 95%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Пример 6.

2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]ацетамида метан-сульфонат.

Водный раствор 2,0 моль/л метансульфоновой кислоты (6,00 мл, 12,00 ммоль) добавляли к суспензии 2-[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]ацетамида (4,00 г, 8,02 ммоль) в изопропиловом спирте (80 мл) при комнатной температуре, и полученную смесь затем перемешивали при 60°C до тех пор, пока реакционная смесь не превращалась в раствор. Затем полученный раствор выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционный раствор вместе с осажденным твердым веществом перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, и образовавшееся твердое вещество собирали фильтрацией. Полученное твердое вещество сушили при пониженном давлении с получением целевого соединения (4,14 г, 6,95 ммоль, выход: 87%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Пример 7.

2-[6-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[1-метил-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]ацетамид.

Пропилфосфоновый ангидрид (50% раствор в этилацетате, приблизительно 1,7 моль/л, 0,18 мл, 0,306 ммоль) добавляли к раствору 1-метил-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1Н-пиразол-5-амин (48 мг, 0,313 ммоль, соединение, синтезированное на второй стадии примера 41 в разделе 153 патентной публикации WO 2014/141187), 2-[6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]уксусной кислоты (68 мг, 0,208 ммоль), полученной в примере 1-3, и пиридина (0,050 мл, 0,618 ммоль) в N,N-диметилформамиде (1 мл), и полученную смесь затем перемешивали при 80°C в течение 2,5 ч. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и затем перемешивали в течение ночи. Затем, к реакционному раствору добавляли пиридин (0,017 мл, 0,210 ммоль) и пропилфосфоновый ангидрид (50% раствор в этилацетате, приблизительно 1,7 моль/л, 0,061 мл и 0,104 ммоль), и полученную смесь затем перемешивали при 80°C в течение 2,5 ч. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли к нему насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия (10 мл). Смешанный раствор экстрагировали этилацетатом три раза, и полученные экстракты затем объединяли. Объединенный экстракт сушили над безводным сульфатом натрия и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток последовательно очищали колоночной хроматографией на силикагеле (метанол/дихлорметан) и затем колоночной хроматографией на силикагеле (NH силикагель, метанол/дихлорметан). Полученный неочищенный продукт суспендировали в диэтиловом эфире и твердое вещество собирали фильтрацией с получением целевого соединения (48,9 мг, 0,095 ммоль, выход: 46%) в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 8.

Альтернативный метод синтеза метил [6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил) пиридин-3-ил]ацетата.

8-1. 2-Амино-4,5-диметоксибензальдегид.

Суспензию 4,5-диметокси-2-нитробензальдегида (5,00 г, 23,7 ммоль), 0,1 моль/л хлористоводородной кислоты (10 мл) и 150 мкг порошка железа (5,17 г, 92,6 ммоль) в этаноле (70 мл) перемешивали при 80°C в течение 2,5 ч. Затем реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит (KANTO KAGAKU, Celite 545). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. К остатку добавляли этилацетат и смесь фильтровали через силикагель. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и затем сушили с получением целевого соединения (3,96 г, 21,9 ммоль, выход: 92%) в виде красного твердого вещества. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 3,85 (3H, c), 3,89 (3H, c), 6,00-6,17 (3H, m), 6,88 (1H, c), 9,69 (1H, c). MS m/z: 182 (M+H)⁺.

8-2. Метил (6-{[три(пропан-2-ил)силил]этинил}пиридин-3-ил)ацетат.

Через суспензию йодида меди(I) (15,1 мг, 0,079 ммоль), бис(трифенилфосфин)палладия(II) дихлорида (58,0 мг, 0,083 ммоль), метил 2-(6-хлорпиридин-3-ил)ацетата (517 мг, 2,79 ммоль), триэтиламина (1,20 мл, 8,61 ммоль) и триизопропил-силилацетилен (1,20 мл, 5,35 ммоль) в N,N-диметилформамиде (1 мл) барботировали азот. Затем реакционную систему продували азотом и суспензию перемешивали при 80°C в течении 5,5 ч. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и затем добавляли к ней воду и насыщенный солевой раствор, затем экстрагировали этилацетатом. Экстракт сушили над безводным сульфатом натрия и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной

хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат) с получением целевого соединения (888 мг, 2,55 ммоль, выход: 92%) в виде светло-желтого маслянистого вещества. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 1,06-1,18 (21H, м), 3,62 (2H, с), 3,69 (3H, с), 7,40-7,45 (1H, м), 7,54-7,61 (1H, м), 8,44-8,48 (1H, м). MS m/z: 332 (M+H)⁺.

8-3. Метил (6-этинилпиридин-3-ил)ацетат.

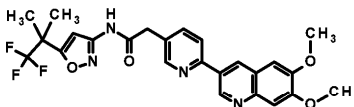
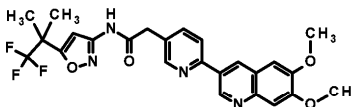
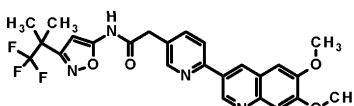
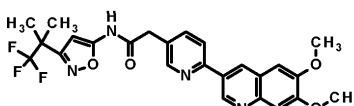
Тетрабутиламмония фторид (раствор 1 моль/л в тетрагидрофуране, 17 мл) добавляли к раствору метил (6-[[три(пропан-2-ил)силил]этинил]пиридин-3-ил)ацетата (3,76 г, 10,82 ммоль) и уксусной кислоты (1 мл) в тетрагидрофуране (8,5 мл) при 0°C в атмосфере азота, и полученную смесь затем перемешивали в течение 5 мин. Температуру реакционного раствора повышали до комнатной температуры, и раствор перемешивали в течение 30 мин. Затем реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и к концентрату добавляли 3 моль/л хлористоводородной кислоты (12 мл). Водную фазу промывали гексаном и добавляли к ней раствор 5 моль/л гидроксида натрия (7 мл), затем экстрагировали смесь этилацетатом три раза. Органические слои объединяли, и объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и затем концентрировали при пониженном давлении. К остатку добавляли этилацетат, и полученную смесь фильтровали через NH силикагель. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением целевого соединения (1,83 г, 9,57 ммоль, выход: 88%) в виде коричневого твердого вещества. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 3,15 (1H, с), 3,65 (2H, с), 3,72 (3H, с), 7,43-7,49 (1H, м), 7,60-7,66 (1H, м), 8,47-8,52 (1H, м). MS m/z: 176 (M+H)⁺.

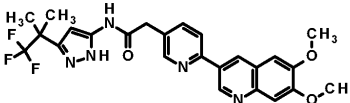
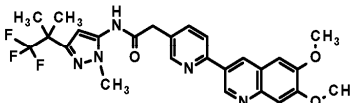
8-4. Метил [6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридил-3-ил]ацетат.

Анилин (0,110 мл, 1,207 ммоль) добавляли к суспензии метил (6-этинилпиридин-3-ил)ацетата (103 мг, 0,539 ммоль), 2-амино-4,5-диметоксибензальдегида (130 мг, 0,715 ммоль) и трифторметан-сульфоната серебра (29,4 мг, 0,114 ммоль) в дихлорэтано (1 мл), и полученную смесь затем перемешивали в атмосфере азота при 80°C в течение 2 ч. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и затем очищали колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат). К полученному недостаточно очищенному продукту добавляли хлороформ, и нерастворимые вещества удаляли фильтрацией. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением целевого соединения (135 мг, 0,398 ммоль, выход: 74%) в виде зеленого твердого вещества. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 3,72 (2H, с), 3,75 (3H, с), 4,04 (3H, с), 4,07 (3H, с), 7,16 (1H, с), 7,47 (1H, с), 7,75-7,82 (1H, м), 7,82-7,89 (1H, м), 8,59-8,68 (2H, м), 9,29-9,35 (1H, м). MS m/z: 339 (M+H)⁺.

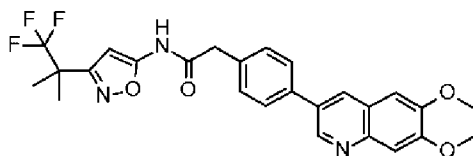
Данные ЯМР и масс-спектрометрии для соединений, описанных в примерах 1-7, и структуры соответствующих соединений в свободной форме представлены ниже.

Таблица 1

Пример №	Данные ЯМР и масс-спектрометрии	Структура
1	^1H -ЯМР (CDCl_3) δ : 1,58 (6H, c), 3,84 (2H, c), 4,04 (3H, c), 4,07 (3H, c), 7,03 (1H, c), 7,16 (1H, c), 7,47 (1H, c), 7,81-7,88 (2H, м), 8,63 (1H, д, $J=1,8$ Гц), 8,69 (1H, д, $J=1,2$ Гц), 8,98 (1H, c), 9,31 (1H, д, $J=2,4$ Гц). MS m/z: 501 (M+H) ⁺ .	
2	^1H -ЯМР (CDCl_3) δ : 1,53 (6H, c), 3,07 (3H, c), 3,92 (2H, c), 4,12 (3H, c), 4,15 (3H, c), 6,94 (1H, c), 7,53 (1H, c), 7,76 (1H, c), 7,88 (2H, c), 8,49 (1H, c), 9,22 (1H, д, $J=1,8$ Гц), 9,25 (1H, д, $J=1,8$ Гц), 10,21 (1H, c). MS m/z: 501 (M+H-96) ⁺ .	
3	^1H -ЯМР (CDCl_3) δ : 1,55 (6H, c), 3,82 (2H, c), 4,04 (3H, c), 4,06 (3H, c), 6,52 (1H, c), 7,16 (1H, c), 7,46 (1H, c), 7,75-7,83 (2H, м), 8,56 (1H, д, $J=1,8$ Гц), 8,61 (1H, д, $J=2,4$ Гц), 9,19 (1H, д, $J=1,8$ Гц), 9,70 (1H, c). MS m/z: 501 (M+H) ⁺ .	
4	^1H -ЯМР (CDCl_3) δ : 1,47 (6H, c), 3,10 (3H, c), 3,94 (2H, c), 4,12 (3H, c), 4,14 (3H, c), 6,35 (1H, c), 7,46 (1H, c), 7,77-7,80 (2H, м), 7,88 (1H, дд, $J=7,9, 2,4$ Гц), 8,52 (1H,	

	д, J=1,8 Гц), 9,13 (1H, д, J=1,8 Гц), 9,29 (1H, д, J=1,8 Гц), 11,18 (1H, с). MS m/z: 501 (M+H-96) ⁺ .	
5	¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆) δ: 1,49 (6H, с), 3,74 (2H, с), 3,94 (3H, с), 3,96 (3H, с), 6,55 (1H, с), 7,42 (1H, с), 7,47 (1H, с), 7,87 (1H, дд, J=8,5, 2,4Hz), 8,10 (1H, д, J=8,5 Гц), 8,65 (1H, д, J=1,8 Гц), 8,83 (1H, д, J=1,8 Гц), 9,37 (1H, д, J=2,4Hz), 10,81 (1H, с), 12,57 (1H, с). MS m/z: 500 (M+H) ⁺ .	
6	¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆) δ: 1,52 (6H, с), 3,05 (3H, с), 3,73 (2H, с), 4,12 (3H, с), 4,14 (3H, с), 6,52 (1H, с), 7,49-7,73 (4H, м), 8,32 (1H, с), 8,96 (1H, с), 9,21 (1H, д, J=1,8 Гц), 10,48 (1H, с). MS m/z: 500 (M+H-96) ⁺ .	
7	¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆) δ: 1,41 (6H, с), 3,66 (3H, с), 3,82 (2H, с), 3,92 (3H, с), 3,95 (3H, с), 6,28 (1H, с), 7,42 (1H, с), 7,49 (1H, с), 7,89 (1H, дд, J=8,5, 2,4 Гц), 8,11 (1H, д, J=8,5 Гц), 8,65 (1H, д, J=1,8 Гц), 8,88 (1H, с), 9,38 (1H, д, J=2,4 Гц), 10,31 (1H, с). MS m/z: 514 (M+H) ⁺ .	

Референсный пример 1.



Стадия 1. Этил [4-(6,7-диметоксхинолин-3-ил)фенил]ацетат.

К раствору 3-бром-6,7-диметокси-хинолина (2,0 г, 7,5 ммоль), пинаколового эфира 4-(этоксикарбонилметил)фенилбороновой кислоты (2,6 г, 9,0 ммоль) и аддукта 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]палладий(II) дихлорида с дихлорметаном (0,61 г, 0,75 ммоль) в 1,4-диоксане (36 мл) добавляли раствор карбоната натрия (2,4 г, 22 ммоль) в воде (4,0 мл), и реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 3 ч. Реакционную смесь распределяли между водой (0,15 л) и дихлорметаном (2×0,15 л). Объединенный органический слой промывали водой (80 мл), затем соевым раствором (30 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и испаряли досуха. Очистка колоночной флэш-хроматографией (дихлорметан/метанол) давала этил 2-[4-(6,7-диметокси-3-хинолил)фенил]ацетат (2,5 г, 7,0 ммоль, 94% выход) в виде светло-коричневого твердого

вещества. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,29 (3H, т, $J=7,2$ Гц), 3,69 (2H, с), 4,04 (3H, с), 4,06 (3H, с), 4,19 (2H, q, $J=7,2$ Гц), 7,11 (1H, с), 7,43-7,44 (3H, м), 7,66 (2H, д, $J=7,8$ Гц), 8,15 (1H, д, $J=2,0$ Гц), 8,97 (1H, д, $J=2,0$ Гц). MS m/z: 352 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Стадия 2. [4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]уксусная кислота.

[4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]уксусную кислоту получали в виде желтого твердого вещества, используя методику, аналогичную методике, описанной в примере 1-3, заменяя метил [6-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)пиридин-3-ил]ацетат, используемый в примере 1-3, на этил [4-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)фенил]ацетат. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6) δ : 3,65 (2H, с), 3,93 (3H, с), 3,95 (3H, с), 7,41-7,42 (4H, м), 7,77 (2H, д, $J=8,3$ Гц), 8,44 (1H, д, $J=2,0$ Гц), 9,01 (1H, д, $J=2,0$ Гц), 12,38 (1H, с). MS m/z: 324 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

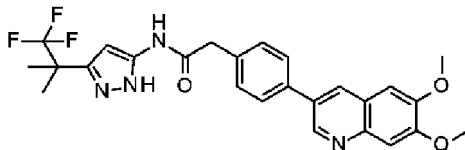
Стадия 3. 2-[4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид.

2-[4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид получали в виде желтого твердого вещества, используя методику, аналогичную методике, описанной в примере 3, заменяя [6-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)пиридин-3-ил]уксусную кислоту, используемую в примере 3, на [4-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)фенил]уксусную кислоту. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,54 (6H, с), 3,86 (2H, с), 4,05 (3H, с), 4,07 (3H, с), 6,49 (1H, с), 7,12 (1H, с), 7,44-7,46 (3H, м), 7,72-7,74 (2H, м), 8,11 (1H, с), 8,17 (1H, д, $J=2,4$ Гц), 8,95 (1H, д, $J=2,4$ Гц). MS m/z: 500 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Стадия 4. 2-[4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамида мезилат.

2-[4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамида мезилат получали, используя методику, аналогичную методике, описанной в примере 4, заменяя 2-[6-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид, используемый в примере 4, на 2-[4-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)фенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,49 (6H, с), 3,05 (3H, с), 3,88 (2H, с), 4,11 (3H, с), 4,16 (3H, с), 6,41 (1H, с), 7,35 (1H, с), 7,49 (2H, д, $J=7,8$ Гц), 7,55 (2H, д, $J=7,8$ Гц), 7,90 (1H, с), 8,71 (1H, с), 8,92 (1H, с), 9,78 (1H, с). MS m/z: 500 ($\text{M}+\text{H}-96$) $^+$.

Референсный пример 2.



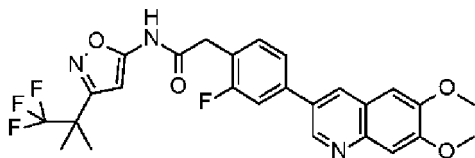
Стадия 1. Третбутил 5-({[4-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)фенил]ацетил}амино)-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-1-карбоксилат.

Третбутил 5-({[4-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)фенил]ацетил}-амино)-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-1-карбоксилат получали в виде бесцветного твердого вещества, используя методику, аналогичную методике, описанной в примере 5-2, заменяя [6-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)пиридин-3-ил]уксусную кислоту, используемую в примере 5-2, на [4-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)фенил]уксусную кислоту. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,51 (6H, с), 1,59 (9H, с), 3,83 (2H, с), 4,05 (3H, с), 4,07 (3H, с), 6,92 (1H, с), 7,11 (1H, с), 7,46-7,49 (3H, м), 7,70-7,72 (2H, м), 8,16 (1H, д, $J=1,8$ Гц), 8,97 (1H, д, $J=2,4$ Гц), 10,23 (1H, с). MS m/z: 599 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Стадия 2. 2-[4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]ацетамид.

2-[4-(6,7-Диметоксифинолин-3-ил)фенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]ацетамид получали в виде бесцветного твердого вещества, используя методику, аналогичную методике, описанной в примере 5-3, заменяя третбутил 5-({[6-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)пиридин-3-ил]ацетил}амино)-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-1-карбоксилат, используемый в примере 5-3, на третбутил 5-({[4-(6,7-диметоксифинолин-3-ил)фенил]ацетил}амино)-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-1-карбоксилат. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,53 (6H, с), 3,81 (2H, с), 4,05 (3H, с), 4,06 (3H, с), 6,47 (1H, уш.с), 7,12 (1H, с), 7,25-7,29 (1H, м), 7,43-7,46 (3H, м), 7,69 (2H, д, $J=7,9$ Гц), 7,93 (1H, с), 8,15 (1H, с), 8,94 (1H, с). MS m/z: 499 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Референсный пример 3.



Стадия 1. Метил (4-бром-2-фторфенил)ацетат.

К перемешиваемому раствору 4-бром-2-фторфенилуксусной кислоты (2,5 г, 11 ммоль) и карбоната калия (4,5 г, 32 ммоль) в N,N-диметилформамиде (30 мл) добавляли йодметан (0,80 мл, 13 ммоль) при 0°C, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь выдерживали в течение ночи. Возобновляли перемешивание при комнатной температуре в течение еще 1 ч. Реакционную смесь распределяли между насыщенным водным раствором NaHCO₃ (150 мл) и этилацетатом (2×100 мл). Объединенный этилацетатный слой промывали водой (60 мл), затем соевым раствором (30 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и испаряли досуха с получением метил (4-бром-2-фторфенил)ацетата (2,5 г, 10 ммоль, 96% выход) в виде бесцветной жидкости. ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ: 3,63 (2H, с), 3,71 (3H, с), 7,14-7,15 (1H, м), 7,24-7,25 (1H, м), 7,27-7,27 (1H, м).

Стадия 2. Метил [4-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)-2-фтор-фенил]ацетат.

Раствор метил 2-(4-бром-2-фторфенил)ацетата (0,58 г, 2,3 ммоль), бис(пинаколато)дибора (0,65 г, 2,6 ммоль), аддукта [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]палладия(II) дихлорида с дихлорметаном (0,19 г, 0,23 ммоль) и ацетата калия (0,69 г, 7,0 ммоль) в 1,4-диоксане (8,0 мл) нагревали при 100°C в течение 1 ч. К этой полученной смеси добавляли 3-бром-6,7-диметокси-хинолин (0,50 г, 1,9 ммоль) и карбонат натрия (0,74 г, 7,0 ммоль), растворенный в воде (2,0 мл), и продолжали перемешивание при 100°C в течение 3 ч. Реакционную смесь распределяли между водой (70 мл) и дихлорметаном (2×70 мл). Объединенный органический слой промывали водой (40 мл), затем соевым раствором (20 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и испаряли досуха. Очистка колоночной флэш-хроматографией (дихлорметан/метанол) давала метил 2-[4-(6,7-диметокси-3-хинолил)-2-фтор-фенил]ацетат (0,64 г, 1,8 ммоль) в виде красно-коричневого твердого вещества. ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ: 3,74-3,76 (5H, м), 4,05 (3H, с), 4,06 (3H, с), 7,11 (1H, с), 7,40-7,44 (4H, м), 8,14 (1H, д, J=2,0 Гц), 8,95 (1H, д, J=2,0 Гц). MS m/z: 356 (M+H)⁺.

Стадия 3. [4-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)-2-фторфенил]уксусная кислота.

[4-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)-2-фторфенил]уксусную кислоту получали в виде желтого твердого вещества, используя методику, аналогичную методике, описанной в примере 1-3, заменяя метил [6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]ацетат, используемый в примере 1-3, на метил [4-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)-2-фтор-фенил]ацетат. ¹H-ЯМР (DMSO-D₆) δ: 3,70 (2H, с), 3,93 (3H, с), 3,96 (3H, с), 7,40-7,41 (2H, м), 7,49 (1H, т, J=8,1 Гц), 7,64-7,65 (1H, м), 7,68-7,70 (1H, м), 8,51 (1H, с), 9,04 (1H, д, J=2,0 Гц), 12,52 (1H, с). MS m/z: 342 (M+H)⁺.

Стадия 4. 2-[4-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)-2-фторфенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид.

2-[4-(6,7-Диметоксихинолин-3-ил)-2-фторфенил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид получали в виде желтого твердого вещества, используя методику, аналогичную методике, описанной в примере 3, заменяя [6-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)пиридин-3-ил]уксусную кислоту, используемую в примере 3, на [4-(6,7-диметоксихинолин-3-ил)-2-фторфенил]уксусную кислоту. ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ: 1,54 (6H, с), 3,87 (2H, с), 4,05 (3H, с), 4,07 (3H, с), 6,49 (1H, с), 7,12 (1H, с), 7,46-7,47 (3H, м), 7,51-7,52 (1H, м), 8,15 (1H, д, J=2,4 Гц), 8,34 (1H, с), 8,93 (1H, д, J=2,4 Гц). MS m/z: 518 (M+H)⁺.

Примеры испытаний

Пример испытания 1. Оценка ингибирующей активности в отношении RET киназы (бесклеточная система).

Реакционный буфер (100 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 0,003% Brij-35, 0,004% Tween-20 и 1 mM DTT) смешивали с RET рекомбинантным белком (RET - немутантного типа; Invitrogen #PV3819, конечная концентрация: 80 пг/мкл, или RET с мутацией гена привратника (V804L); Invitrogen #PV4397, конечная концентрация: 80 пг/мкл) с получением раствора RET киназы. Приготавливали испытуемое соединение с конечной концентрацией 4000 нМ с DMSO и затем приготавливали образцы испытуемого соединения при 12 различных концентрациях с шагом разбавления √10, добавляли 19 мкл раствора RET киназы в каждую из лунок линий А-Р 384-луночного планшета, и затем добавляли в каждую из лунок линии С-Н испытуемое соединение при каждой концентрации, и затем добавляли 1 мкл диметилсульфоксида (обозначаемого в изобретении как DMSO) в каждую из лунок линий А, В, О и Р. Затем каждую из полученных смесей подвергали предварительно инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин. Кроме того, приготавливали субстратный раствор А, содержащий АТФ (конечная концентрация: 1 мМ), и субстратный раствор В, не содержащий АТФ, оба в дополнение к реакционному буферу и FL-Peptide 22 (PerkinElmer, #760366, конечная концентрация: 1,5 мкМ). Субстратный раствор А добавляли в количестве 5 мкл в лунки линий В-О, в то время как субстратный раствор В добавляли в количестве 5 мкл в лунки линий А и Р. Каждую из полученных смесей подвергали инкубации при 28°C в течение 45 мин. Для прерывания реакции к реакционной смеси добавляли в количестве 40 мкл раствор для прерывания реакции (100 mM HEPES (pH 7,4), 0,015% Brij-35, 40 mM EDTA и 0,1% Coating Reagent 3).

Используя прибор EZ Reader II (Perkin Elmer), пептидный субстрат отделяли от фосфорилированного пептида в реакционном растворе, и для оценки использовали отношение продуктов (P/(P+S)), рассчитанное по пику (S) пептидного субстрата и пику (P) фосфорилированного пептида. Ингибирующее дей-

ствие испытуемого соединения при каждой концентрации рассчитывали по следующей формуле (автоматизированный расчет с помощью программного обеспечения EZ Reader II System).

$$\text{Ингибирование (\%)} = 100 \times (1 - C_i/C_o) \quad (a)$$

C_i : степень превращения в реакции испытуемого соединения с субстратным раствором А - степень превращения в реакции DMSO с субстратным раствором В.

C_o : степень превращения в реакции DMSO с субстратным раствором А - степень превращения в реакции DMSO с субстратным раствором В.

На основе степеней ингибирования для испытуемого соединения при 12 различных концентраций, рассчитанных по формуле (а), была построена кривая 4-параметрической логистической регрессии. В данный момент времени уравнение 4-параметрической логистической регрессии выражается следующим образом.

$$\text{Ингибирование (\%)} = \text{Нижнее значение} + (\text{Верхнее значение} - \text{Нижнее значение}) / (1 + (X/IC_{50})^{\text{Наклон}}) \quad (b)$$

Верхнее значение: верхняя асимптота.

Наклон: параметр наклона.

IC_{50} : величина X для (Верх+Низ)/2.

Нижнее значение: нижняя асимптота.

X: концентрация испытуемого соединения.

Сначала, любые заданные исходные значения вводят в "Верхнее значение", "Наклон", " IC_{50} ", "Нижнее значение" (Верхнее значение=100, Наклон=-1, IC_{50} =приблизительное значение IC_{50} , и Нижнее значение=0) для построения кривой регрессии. Затем применяли метод наименьших квадратов для суммирования квадратов разницы между измеренным значением и оцененным значением, полученным из формулы (b), для расчета коэффициента уравнения 4-параметрической логистической регрессии, для того чтобы рассчитать IC_{50} .

Таблица 2

Соединение примера №	RET-немутантная IC_{50} (нМ)	RET-V804L IC_{50} (нМ)
3	4,6	6,3
5	2,2	2,7
Алектиниб*	52	811

*) Алектиниб: 9-этил-6,6-диметил-8-[4-(морфолин-4-ил)-пиперидин-1-ил]-11-оксо-6,11-дигидро-5H-бензо[b]карбазол-3-карбонитрил.

Пример испытания 2. Оценка ингибирующей активности в отношении KDR киназы (клеточная система).

Клетки линии HUVEC высевали в планшете с плотностью 1500 клеток на лунку и затем культивировали в течение ночи. В каждую лунку добавляли испытуемое соединение (10 мкМ, 2,5 мкМ, 625 нМ, 156 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 2,5 нМ или 0,6 нМ) добавляли, затем культивировали полученную смесь в течение 2 ч. Затем в культуру клеток добавляли VEGF165 (Peprotech, #100-20) при конечной концентрации 50 нг/мл, и полученную смесь подвергали реакции апри 37°C в течение 5 мин. Затем полученные клетки лизировали с помощью 50 мкл лизирующего буфера, входящего в набор для проведения анализа AlphaLISA SureFire Ultra (Perkin Elmer, #ALSU-PVGFRA-500), затем к 10 мкл лизата клеток добавляли акцепторные гранулы и донорные гранулы в соответствии с инструкцией по использованию, вложенной в упомянутый выше набор. Полученную таким образом смесь подвергали реакции при комнатной температуре в течение ночи и затем измеряли ингибирующую активность в отношении KDR киназы, используя планшет-ридер Envision (Perkin Elmer).

Величину, полученную для лунки, в которую был добавлен только лизирующий буфер, вычитали в качестве фона из всех значений. Затем определяли величину, полученную для лунки, в которую был добавлен VEGFR и не было добавлено испытуемое соединение, в качестве 100% активности KDR киназы, полученную величину корректировали. Используя функцию роста в программе Microsoft Excel 2010, оценивали величину 50% ингибирования для каждого испытуемого соединения и использовали его в качестве величины IC_{50} .

Таблица 3

Соединение примера №	IC_{50} (нМ)
4	298
6	566

Пример испытания 3. Оценка ингибирующей активности в отношении RET киназы (клеточная система).

Клетки линии Va/F3, в которых сверхэкспрессировались Мус меченый RET ген или RET (V804L)

мутантный ген, высевали в планшете с плотностью 500000 клеток в лунке, и затем в каждую лунку добавляли испытуемое соединение (10 мкМ, 2,5 мкМ, 625 нМ, 156 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 2,5 нМ или 0,6 нМ), затем культивировали полученную смесь в течение 2 ч. Затем, к 9 мл MilliQ добавляли 1 мл буфера для лизиса клеток (Cell signaling technology, #9803), одну таблетку ингибитора фосфатазы (Roche, #04906837001) и одну таблетку ингибитора протеазы (Roche, #0469312400), и затем в каждую лунку добавляли 20 мкл полученной смеси. Полученную таким образом смесь помещали на лед на 20 мин, в результате чего происходил лизис клеток. Брали 5 мкл алиquotы клеточного лизата и затем добавляли к алиquotе 64 нл Мус антитела (Cell signaling technology, #3946) и донорные гранулы стрептавидина в равном количестве 102 нл с акцепторными гранулами Р-Тур-100, входящие в набор для анализа Alpha Screen Phosphotyrosine (P-Тур-100) (Perkin Elmer, #6760620С) в соответствии с инструкцией по использованию, вложенной в упомянутый выше набор. Полученную смесь подвергали реакции при комнатной температуре в течение ночи и измеряли ингибирующую активность в отношении RET киназы, используя планшет-ридер Envision.

Из всех значений вычитали в качестве фона значение для лунки, в которую был добавлен только буфер для лизиса, и затем полученную величину корректировали путем определения величины для лунки, в которую не было добавлено испытуемое соединение, в качестве 100% активности RET киназы. Используя функцию роста в программе Microsoft Excel 2010, оценивали величину 50% ингибирования для каждого испытуемого соединения и использовали его в качестве величины IC_{50} .

Таблица 4

Соединение примера №	RET-немутантная IC_{50} (нМ)	RET-V804L IC_{50} (нМ)
3	4	15
5	10	15
Алектиниб*	161	2141

*) Алектиниб: 9-этил-6,6-диметил-8-[4-(морфолин-4-ил)-пиперидин-1-ил]-11-оксо-6,11-дигидро-5Н-бензо[b]карбазол-3-карбонитрил

Пример испытания 4. Измерение ингибирующей активности в отношении роста клеток с использованием линии клеток LC-2/ad немелкоклеточного рака легкого.

Измеряли ингибирующую активность испытуемого соединения в отношении роста клеток линии LC-2/ad немелкоклеточного рака легкого, имеющих CCDC6-RET гибридный ген (RIKEN, J Thorac Oncol. 2012 Dec, 7(12), 1872-6).

Клетки линии LC-2/ad высевали в 96-луночном планшете при плотности 5000 клеток на лунку и затем культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение ночи в среде, приготовленной смешением RPMI-1640, содержащей 15% FBS и 25 мМ HEPES, со смесью Ham's F12 Mixture при соотношении 1:1. Затем испытуемое соединение разбавляли и добавляли в 96-луночный планшет. В качестве отрицательного контроля добавляли диметилсульфоксид (обозначаемый в изобретении как DMSO). Полученную смесь культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение 9 дней, затем добавляли в культуру клеток реагент из набора для люминисцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo(R) Luminescent Cell Viability Assay (Promega, #G7571), позволяющий определить количество клеток, и затем смесь перемешивали. Затем измеряли интенсивность люминесценции, используя планшет-ридер Envision. Измеренную величину для лунки, в которую была добавлена только среда, принимали за 0% выживших клеток, и измеренную величину для лунки, в которую была добавлен только DMSO, принимали за 100% выживание клеток. Рассчитывали процент выживания клеток линии LC-2/ad в присутствии каждой концентрации испытуемого соединения. Используя функцию роста в программе Microsoft Excel 2010, оценивали величину 50% ингибирования для каждого испытуемого соединения и использовали его в качестве величины IC_{50} .

Таблица 5

Соединение примера №	IC_{50} (нМ)
4	49
5	82
Алектиниб*	308

*) Алектиниб: 9-этил-6,6-диметил-8-[4-(морфолин-4-ил)-пиперидин-1-ил]-11-оксо-6,11-дигидро-5Н-бензо[b]карбазол-3-карбонитрил

Пример испытания 5. Измерение ингибирующей активности в отношении роста клеток линии ТТ рака щитовидной железы.

Измеряли ингибирующую активность испытуемого соединения на рост клеток линии ТТ рака щитовидной железы, имеющих RET активирующую мутацию (С634W) (Biochemical and Biophysical Re-

search Communications. 1995 Feb 27 (207), 1022-1028).

Клетки линии ТТ высевали в 96-луночном планшете при плотности 5000 клеток на лунку и затем культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение ночи в среде питательной смеси F-12K, содержащей 10% FBS. Затем испытуемое соединение разбавляли и добавляли в 96-луночный планшет. В качестве отрицательного контроля добавляли диметилсульфоксид (обозначаемый в изобретении как DMSO). Полученную смесь культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение 9 дней, затем добавляли в культуру клеток реагент из набора для люминисцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo(R) Luminescent Cell Viability Assay и затем смесь перемешивали. Затем измеряли интенсивность люминесценции, используя планшет-ридер Envision (Perkin Elmer). Измеренную величину для лунки, в которую была добавлена только среда, принимали за 0% выживших клеток и измеренную величину для лунки, в которую была добавлен только DMSO, принимали за 100% выживание клеток. Рассчитывали процент выживания клеток линии ТТ в присутствии каждой концентрации испытуемого соединения. Используя функцию роста в программе Microsoft Excel 2010, оценивали величину 50% ингибирования для каждого испытуемого соединения и использовали его в качестве величины IC₅₀.

Таблица 6

Соединение примера №	IC ₅₀ (нМ)
4	6
5	17
Алектиниб*	112

*) Алектиниб: 9-этил-6,6-диметил-8-[4-(морфолин-4-ил)пиперидин-1-ил]-11-оксо-6,11-дигидро-5Н-бензо[*b*]карбазол-3-карбонитрил

Пример испытания 6. Оценка противоопухолевой активности с использованием ксенотрансплантатной модели, созданной с помощью линии клеток LC-2/ad немелкоклеточного рака легкого

Клетки линии LC-2/ad Cells немелкоклеточного рака легкого (RIKEN, J Thorac Oncol. 2012 Dec, 7(12), 1872-6), суспендированные в DPBS (Gibco, #14190), смешивали с равным количеством препарата матрицы базальной мембраны Corning Matrigel Basement Membrane Matrix (Corning, #354234) и полученную смесь затем подкожно трансплантировали мышам линии NOG для образования опухоли. (Мышей линии NOG акклиматизировали после их доставки фирмой In Vivo Science Inc., затем мышам в возрасте 9 недель трансплантировали клетки. В качестве корма использовали FR-2 (фирмы Funabashi Farm Co., Ltd.)) После достижения опухолью размера 100-200 мм³ мышей рандомизировали на основе диаметра опухоли и затем начинали пероральное введение соединения примера 4 (далее обозначаемое как соединение А). В качестве растворителя для растворения соединения А использовали 1% гидроксипропилметилцеллюлозу. Пероральное введение соединения А в дозе 3 мг/кг или 1 мг/кг массы тела мыши три раза в сутки непрерывно проводили в течение 9 дней (где группа, в которой вводили 3 мг/кг соединения А три раза в сутки, обозначена как группа а (■), где группа, в которой вводили 1 мг/кг соединения А три раза в сутки, обозначена как группа b (▲), и группа, в которой вводили только растворитель (плацебо), обозначена как группа плацебо (◆)). В результате, наблюдали дозозависимый регресс опухоли (фиг. 1). В процессе этого исследования наблюдалось значимое уменьшение массы опухоли в группах, в которых вводили соединение А, по сравнению с группой, в которой вводили плацебо. Кроме того, собирали опухоль (введение в группе плацебо не проводили) через 2 и через 6 ч после завершающего введения соединения А, и затем методом вестерн-блоттинга детектировали RET фосфорилирование тирозина в положении 905, используемое в качестве показателя активности RET киназы (pRET(Y905), Nature Medicine, 18, 375-377 (2012)). В результате было подтверждена дозозависимое подавление фосфорилирования Y905 (фиг. 2).

Сравнительные данные 1.

Величины RET IC₅₀ и KDR IC₅₀ (клеточная система) для соединений по изобретению (табл. 7) и сравнительных соединений (табл. 8) приведены ниже. Из табл. 8 является очевидным, что сравнительные соединения проявляют одинаковую активность в отношении RET и KDR. В отличие от этого, представленные в табл. 7 данные показывают, что соединения по изобретению проявляют селективность в отношении RET по сравнению с KDR.

Таблица 7

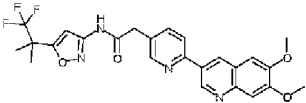
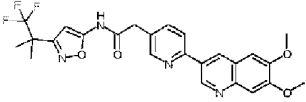
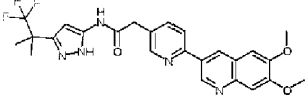
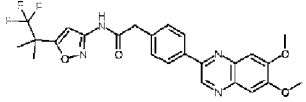
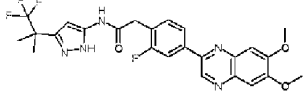
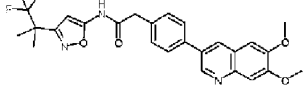
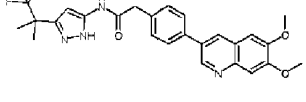
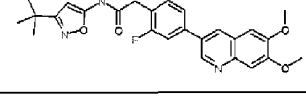
Соединение примера №	Структура	IC50 (нМ) RET	Форма	IC50 (нМ) KDR	Форма
Пример 1 (свободная)/ Пример 2 (мезилат)		18	Свободная	828	Мезилат
Пример 3 (свободная)/ Пример 4 (мезилат)		4	Свободная	287	Мезилат
Пример 5 (свободная)/ Пример 6 (мезилат)		10	Свободная	566	Мезилат

Таблица 8

W 02015 / 031613 Пример № / Соединение №	Структура	IC50 (нМ) RET	Форма	IC50 (нМ) KDR	Форма
Пример 8		7	Свободная	9	Свободная
Пример 182		2	Свободная	1,5	Свободная
Референсный пример 1		8	Свободная	7	Мезилат
Референсный пример 2		5	Свободная	16	Свободная
Референсный пример 3		8	Свободная	6	Свободная

Сравнительные данные 2. Одновременное исследование фармакокинетики и фармакодинамики (PKPD).

Мышечные клетки линии рго-B, Ва/F3, экспрессирующие гибридный белок ets variant 6 (ETV)-RET и ETV-RET-V804L, были сконструированы компанией Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd., и их культивировали в среде RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific KK) с добавлением 10% (по объему) термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS, GE Healthcare) и 1,5 мкг/мл пуромидина в CO₂ инкубаторе, в котором поддерживали температуру 37°C и атмосферу с 5% CO₂. Клетки суспендировали в DPBS и инокулировали подкожно мышам по 1,0×10⁷ клеток на мышь. После того как опухоль достигла размера от 100 до 200 мм³, мышей рандомизировали на основе диаметра опухоли и вводили им перорально испытуемые соединения (10 мг/кг соединение 229 или соединение из примера 3), которые были растворены в 1% (масса на единицу объема) растворе гидроксипропилметилцеллюлозы. Контрольной группе вводили 1% (масса на единицу объема) раствор гидроксипропилметилцеллюлозы. Через 6 ч после введения опухоли вырезали и тут же замораживали в жидком азоте. Замороженные образцы гомогенизировали в гомогенизаторе с шаровой мельницей (Biomedical Science Co., Ltd. и Yasui Kikai Corporation) с буфером для лизиса (Cell Signaling Technology, Inc.) и коктейлем ингибиторов протеазы и фосфатазы (Roche Diagnostics GmbH). Концентрацию белка в лизате опухоли количественно определяли с помощью колориметрического реагента (Thermo Fisher Scientific K.K.) и все концентрации разводили до одинаковой концентрации буфером для лизиса. Лизат опухоли добавляли к буферу для образцов с восстанавливающим реагентом (Thermo Fisher Scientific K.K.) и денатурировали путем нагревания (70°C, 10 мин). Для определения экспрессии фосфо-RET, RET и актина использовали 30, 15 и 15 мкг белка соответственно. Белок разде-

ляли на 5-20% Tris HCl гелях (DRC Co., Ltd.) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Thermo Fisher Scientific K.K.). Мембраны пропитывали кроличьим моноклональным антителом против RET (разведение 1: 1000, № по каталогу 14698, Cell Signaling Technology, Inc.), кроличьим поликлональным антителом против фосфо-RET (Y905) (разведение 1:250, № по каталогу 3221, Cell Signaling Technology, Inc.) и первичными антителами к кроличьему поликлональному антителу против актина (разведение 1:4000, № по каталогу sc-1616R, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), затем HRP-конъюгированным вторичным антителом к кроличьему анти-IgG козьему антителу (разведение 1: 2000, № по каталогу 7074, Cell Signaling Technology, Inc.). Реакцию хемилюминесценции HRP и субстрата (субстрат для вестерн-блоттинга Pierce ECL Plus, № по каталогу 32132, Thermo Fisher Scientific K.K.) обнаруживали с помощью устройства сканирования изображения Typhoon 9400 (GE Healthcare).

Количественно определяли и рассчитывали интенсивности сигналов фосфорилированного RET (pRET) и RET следующими методами.

Степень фосфорилирования RET: (интенсивность сигнала pRET) / (интенсивность сигнала RET)

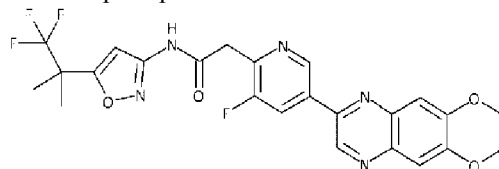
Относительное фосфорилирование RET (%): [(среднее значение степени фосфорилирования RET в образцах, обработанных испытуемым соединением) / (среднее значение степени фосфорилирования RET в образцах, обработанных плацебо)] x 100

Таблица 9

	Биохимическое исследование (неклеточная система)		In vivo исследование	
	IC ₅₀ (нМ) RET-WT	IC ₅₀ (нМ) RET-V804L	Относительное фосфорилирование RET (%) в опухолях Ba/F3-RET (Доза: 10 мг/кг)	Относительное фосфорилирование RET (%) в опухолях Ba/F3-RET-V804M (Доза: 10 мг/кг)
Соединение 229*	1, 5	1, 7	NT	98
Соединение примера 3	4, 6	6, 3	6	NT

NT: испытание не проводили

*Соединение 229 имеет изображенную ниже структуру и описано в патентной публикации WO 2015/031613 в примере № 229



Соединение 229 не подавляло фосфорилированную RET (pRET) в опухолях Ba/F3-RET-V804M вследствие его низкого воздействия в опухолях (данные доступны), хотя соединение 229 проявляло сильное ингибирующее действие in vitro. Низкое воздействие могло быть основной причиной слабой активности соединения 229 in vivo. С другой стороны, соединение из примера 3 вне всякого сомнения ингибировало pRET в опухолях Ba/F3-RET.

Примеры приготовления лекарственных форм

Пример приготовления лекарственной формы 1. Капсула.

Соединение примера 4 или 6	50 мг
Лактоза	128 мг
Кукурузный крахмал	70 мг
Стеарат магния	2 мг
Итого	250 мг

Смешивали порошок, имеющий приведенный выше состав, и пропускали через сито с размером отверстий 60 меш. Затем, этот порошок с суммарной массой 250 мг помещали в желатиновую капсулу с получением лекарственной формы в виде капсулы.

Пример приготовления лекарственной формы 2. Таблетка.

Соединение примера 4 или 6	50 мг
Лактоза	126 мг
Кукурузный крахмал	23 мг
Стеарат магния	1 мг
ИТОГО	200 мг

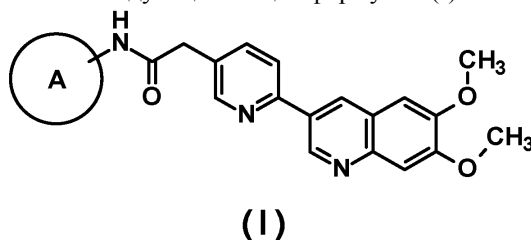
Смешивали порошок, имеющий приведенный выше состав, затем смесь гранулировали, используя пасту кукурузного крахмала, и затем сушили. Используя машину для таблетирования, из реакционной смеси изготавливали таблетки (одна таблетка 200 мг). При необходимости на эти таблетки может быть нанесен слой сахарного покрытия.

Промышленная применимость

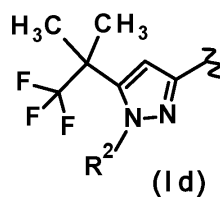
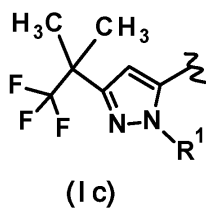
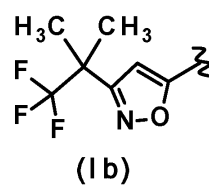
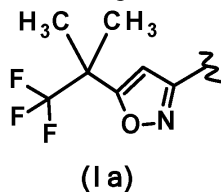
Новое соединение пиридина, представленное описанной выше общей формулой (I), по настоящему изобретению, или его соль, или сольват обладает высоким ингибирующим действием в отношении RET киназы и может применяться в качестве лекарственного препарата.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное следующей общей формулой (I):

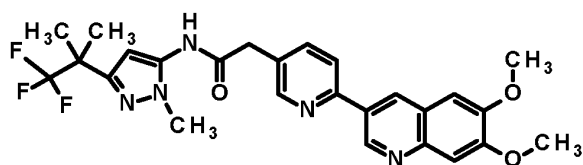
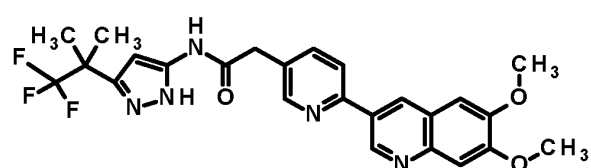
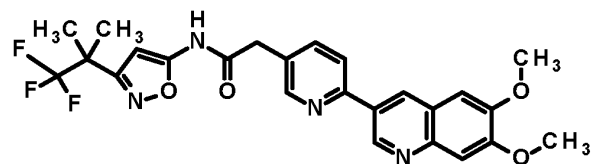
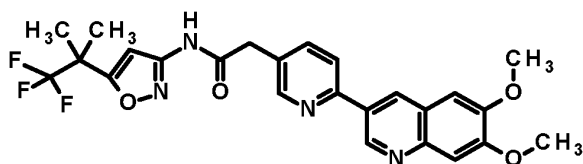


где A представляет фрагмент, выбранный из следующих формул (Ia)-(Id):

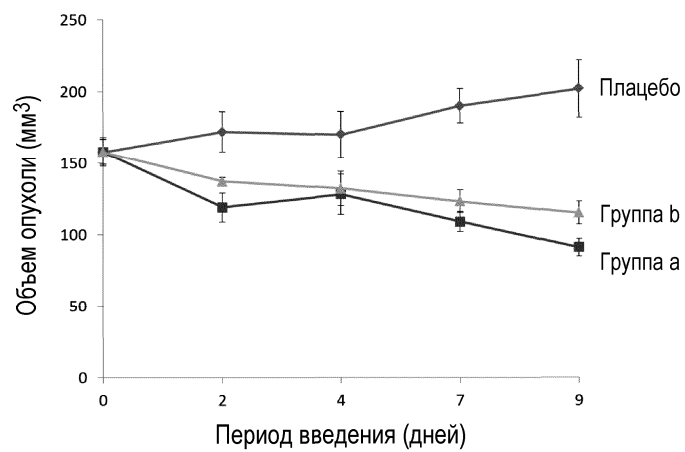


где R¹ представляет атом водорода или C₁-C₃-алкильную группу и R² представляет атом водорода или C₁-C₃-алкильную группу, или его фармацевтически приемлемая соль.

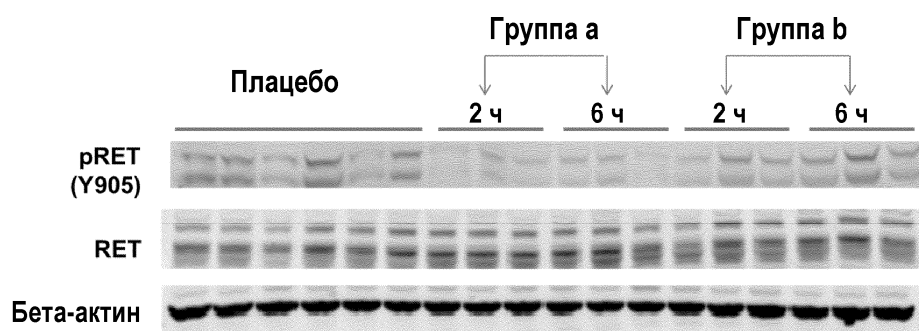
2. Соединение по п.1, выбранное из соединений, представленных следующими структурными формулами:



3. Соединение по п.1, которое представляет собой 2-[6-(6,7-диметоксидинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-3-ил]ацетамид.
4. Соединение по п.1, которое представляет собой 2-[6-(6,7-диметоксидинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1,2-оксазол-5-ил]ацетамид.
5. Соединение по п.1, которое представляет собой 2-[6-(6,7-диметоксидинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]ацетамид.
6. Соединение по п.1, которое представляет собой 2-[6-(6,7-диметоксидинолин-3-ил)пиридин-3-ил]-N-[1-метил-3-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]ацетамид.
7. Соединение по любому одному из пп.2-6 в виде фармацевтически приемлемой соли.
8. Соединение по любому одному из пп.2-6 в виде метансульфонатной соли.
9. Лекарственный препарат для лечения заболевания, вызванного активирующей мутацией или повышенной экспрессией RET киназы, включающий в качестве активного ингредиента соединение по любому одному из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемую соль.
10. Лекарственный препарат по п.9 для предотвращения или лечения рака.
11. Лекарственный препарат по п.9 для лечения рака легкого, рака щитовидной железы, рака молочной железы или рака толстой кишки.
12. Применение соединения по любому одному из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления фармацевтической композиции.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому одному из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемую соль и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.
14. Применение соединения по любому одному из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения или предотвращения рака.
15. Применение соединения по любому одному из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемой соли при производстве лекарственного препарата для лечения или предотвращения рака.
16. Способ лечения или предотвращения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому одному из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемой соли.



Фиг. 1



Фиг. 2

