

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037626

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.22

(21) Номер заявки
201990846

(22) Дата подачи заявки
2017.10.02

(51) Int. Cl. C07D 333/60 (2006.01)
C07D 409/12 (2006.01)
C07D 498/04 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01)
A61K 31/385 (2006.01)
A61K 31/424 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ БЕНЗО[В]ТИОФЕНА КАК АГОНИСТЫ STING

(31) 62/404,062

(32) 2016.10.04

(33) US

(43) 2019.08.30

(86) PCT/US2017/054688

(87) WO 2018/067423 2018.04.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
Алтман Майкл Д., Кэш Брэндон Д.,
Чанг Вонсук, Кьюмминг Джаред Н.,
Хайдл Эндрю М., Хендерсон Тимоти
Дж., Джуэлл Джеймс П., Ларсен
Мэттью А., Лян Жуй, Лим Чжонгвон,
Лу Минь, Отте Райан Д., Сиу
Тони, Троттер Бенджамин Уэсли,
Тягараджан Срирам (US)

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

(56) US-A-4299769

PUSHPARATHINAM GOPINATH ET AL.:
"As many as six tandem reactions in
one step! Unprecedented formation of highly
functionalized benzothiophenes", CHEMICAL
COMMUNICATIONS - CHEMCOM., no.
46, 1 January 2009 (2009-01-01), page
7131, XP055425123, ISSN: 1359-7345, DOI:
10.1039/b914424b scheme 1; page 7131; compound 7f
M.K. BHATTACHARJEE ET AL.:
"SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC STEROIDS-
III* AN UNSUCCESSFUL ATTEMPT
AT THE SYNTHESIS OF B-NOR-6-
THIAEQUILENIN THROUGH 3-CYANO-7-
METHOXY-4-OXO-1,2,3,4-
TETRAHYDRODIBENZOTHIOPHENE",
TETRAHEDRON, vol. 10, 1 January 1960
(1960-01-01), pages 215-222, XP055425187, page
216; compound VI

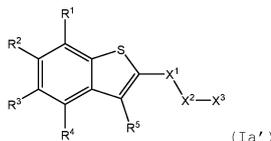
CAGNIANT: "Parsing Failed", BULLETIN
DE LA SOCIETE CHIMIQUE DE FRANCE,
SOCIETE FRANCAISE DE CHIMIE. PARIS,
FRANCE, 1 January 1952 (1952-01-01), page 336,
XP009501564, ISSN: 0037-8968 page 336; compound
1a last paragraph of right column; page 336

WO-A1-2012068702

US-A-4952571

WO-A1-2015077354

(57) Предложены соединения общей формулы (Ia') и их фармацевтически приемлемые соли, где R¹, R², R³, R⁴, R⁵, X¹, X² и X³ являются такими, как определено в описании изобретения, которые могут использоваться в качестве индукторов выработки интерферонов I типа, в частности в качестве активных агентов STING. Также предложены способы синтеза и применения соединений изобретения



B1

037626

037626 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединениям и их производным, которые могут использоваться в качестве агонистов STING (стимулятора генов интерферонов), которые активируют сигнальный путь STING. Настоящее изобретение также относится к способам синтеза и применению таких соединений.

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде

Перечень последовательностей в настоящей заявке представлен в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII, с именем файла "24170_SEQLIST-OCT2017", датой создания 24 августа 2017 г. и размером 25 Кб. Этот перечень последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в данную заявку посредством ссылки.

Уровень техники изобретения

Иммунная система эволюционировала, чтобы распознавать и нейтрализовывать угрозы различного типа с целью поддержания гомеостаза хозяина, и обычно ее подразделяют на две части: адаптивную и врожденную. Адаптивная иммунная система специализируется на распознавании в качестве чужеродных тех антигенов, которые в естественных условиях не экспрессируются в организме хозяина, и на генерации ответа на антиген посредством координированных действий многих подгрупп лейкоцитов.

Отличительным признаком адаптивного иммунного ответа является его способность формировать "память" или длительный иммунитет к обнаруженному антигену. Хотя этот специфический и длительный эффект является критически важным для здоровья и выживания хозяина, в случае адаптивного иммунного ответа требуется какое-то время для создания полноценного ответа.

Врожденная иммунная система компенсирует эту временную задержку и специализируется на быстрой реакции на различные повреждения или сигналы опасности. Она обеспечивает первую линию защиты против бактерий, вирусов, паразитов и других источников инфекции, но также решительно реагирует на некоторые сигналы опасности, связанные с повреждением клетки или ткани. Врожденная иммунная система не имеет специфичности к антигенам, но реагирует посредством множества различных эффекторных механизмов. Опсонизация, фагоцитоз, активация системы комплемента и продуцирование растворимых биоактивных молекул, таких как цитокины или хемокины, представляют собой механизмы, задействованные в генерации ответа врожденной иммунной системой. Отвечая на эти вышеописанные молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), или молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMP), врожденная иммунная система способна обеспечивать общую защиту хозяина против широкого спектра источников опасности.

Несвязанные цитозольные ДНК и РНК входят в число этих PAMP и DAMP. Недавно было продемонстрировано, что основным сенсором цитозольной ДНК является cGAS (циклическая GMP-AMP синтаза). При распознавании цитозольной ДНК cGAS катализирует образование циклического динуклеотида 2'3'-cGAMP, атипичного вторичного мессенджера, который образует прочную связь с ER-трансмембранным адапторным белком STING. cGAMP-связанный STING претерпевает конформационное изменение и перемещается в перинуклеарный компартмент, где индуцирует активацию критически важных факторов транскрипции IRF-3 и NF-κB. Это приводит к сильной индукции интерферонов I типа и выработке провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, TNF-α и IFN-γ.

Важность интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов в различных клетках иммунной системы очень хорошо изучена. В частности, эти молекулы существенно усиливают активацию Т-клеток путем повышения способности дендритных клеток и макрофагов поглощать, процессировать, презентировать и кросс-презентировать антигены Т-клеткам. Способность этих антигенпрезентирующих клеток стимулировать Т-клетки усиливается за счет активации критически важных костимулирующих молекул, таких как CD80 или CD86. Наконец, интерфероны I типа могут быстро задействовать свои когнатные рецепторы и запустить активацию интерферончувствительных генов, которые могут в значительной степени содействовать активации клеток адаптивной иммунной системы.

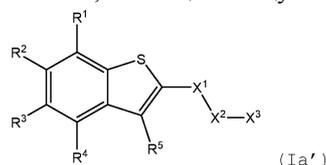
С терапевтической точки зрения показано, что интерфероны I типа имеют противовирусную активность, непосредственно ингибируя репликацию вируса гепатита В и вируса гепатита С человека и стимулируя иммунный ответ на инфицированные вирусом клетки. Соединения, которые могут индуцировать выработку интерферонов I типа, используются в вакцинах, где они действуют в качестве адъювантов, усиливая специфические иммунные ответы на антигены и минимизируя побочные эффекты за счет уменьшения дозы и расширения иммунного ответа.

В дополнение к этому интерфероны и соединения, которые могут индуцировать выработку интерферонов, потенциально пригодны для лечения рака у человека. Такие молекулы потенциально пригодны в качестве противораковых агентов, действующих множеством различных способов. Интерфероны могут напрямую ингибировать пролиферацию опухолевых клеток у человека и могут иметь синергический эффект с различными одобренными химиотерапевтическими агентами. Интерфероны I типа могут в значительной степени усиливать противоопухолевые иммунные ответы, индуцируя активацию клеток как адаптивной, так и врожденной иммунной системы. Наконец, можно подавить инвазивность опухоли с помощью интерферонов посредством модуляции экспрессии фермента, связанной с ремоделированием тканей.

Принимая во внимание потенциал интерферонов I типа и соединений, индуцирующих интерфероны I типа, в качестве противовирусных и противораковых агентов, существует потребность в новых агентах, которые способны индуцировать эффективную выработку интерферонов I типа. С увеличением объема данных, демонстрирующих, что сенсорный путь cGAS-STING цитозольной ДНК обладает значительной способностью индуцировать интерфероны I типа, разработка агентов, активирующих STING, быстро занимает важное место в современной противоопухолевой терапии.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым соединениям общей формулы (Ia'). В частности, настоящее изобретение относится к соединениям, имеющим общую структурную формулу (Ia')



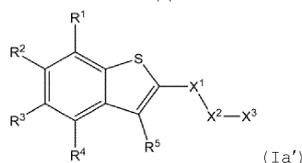
или их фармацевтически приемлемым солям, описанным в настоящей заявке. Варианты осуществления изобретения включают соединения общей формулы (Ia') и их фармацевтически приемлемые соли, а также применения соединений общей формулы (Ia').

Другие варианты осуществления, аспекты и признаки настоящего изобретения дополнительно описаны или станут очевидными из приведенного ниже описания, примеров и прилагаемой формулы изобретения.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение включает соединения общей формулы (Ia') и их фармацевтически приемлемые соли. Эти соединения и их фармацевтически приемлемые соли могут использоваться в качестве агентов для индуцирования иммунных ответов, для индуцирования выработки STING-зависимых интерферонов I типа и/или для лечения нарушения клеточной пролиферации.

Первый вариант осуществления относится к соединениям общей формулы (Ia')



или их фармацевтически приемлемым солям, где R¹ выбран из группы, состоящей из H, F, C₁-C₃ алкила и C₁-C₃ галогеналкила;

R² выбран из группы, состоящей из галогена, C₁-C₃ алкила, C₁-C₃ галогеналкила, ОС₁-C₃ алкила, ОС₁-C₃ галогеналкила, OH, C₂-C₃ алкенила, C₂-C₃ алкинила, N(C₁-C₃ алкила)₂, NH(C₁-C₃ алкила) и SC₁-C₃ алкила;

R³ выбран из группы, состоящей из галогена, C₁-C₃ алкила, C₁-C₃ галогеналкила, ОС₁-C₃ алкила, ОС₁-C₃ галогеналкила, OH, C₂-C₃ алкенила, C₂-C₃ алкинила, N(C₁-C₃ алкила)₂, NH(C₁-C₃ алкила) и SC₁-C₃ алкила;

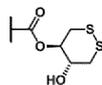
R⁴ выбран из группы, состоящей из H, F, C₁-C₄ алкила и C₁-C₃ галогеналкила;

R⁵ выбран из группы, состоящей из H, F, Cl, OR⁶, C₁-C₃ алкила и C₁-C₃ галогеналкила;

каждый R⁶ независимо выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₄ алкила и C₁-C₄ галогеналкила;

X¹ представляет собой C(O);

X² представляет собой CHR⁸CHR⁸;



X³ выбран из группы, состоящей из COOR⁶, SO₂R⁶ и C(O)N(R⁹)₂, где каждый R⁹ независимо выбран из группы, состоящей из H, COOR⁶ и SO₂R⁶; и

каждый R⁸ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₄ алкила, C₁-C₄ алкила, замещенного OH, C₁-C₄ алкила, замещенного ОС₁-C₃ алкилом, и C₃-C₆ циклоалкила, и где необязательно 2 R⁸ взяты вместе, наряду с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-членного конденсированного кольца; и

где, в случае когда X¹-X²-X³ представляет собой X¹-CHR⁸CH₂-X³, по меньшей мере один из R² и R³ не выбран из группы, состоящей из галогена, OR⁶, C₁-C₆ алкила и C₁-C₆ галогеналкила.

В первом аспекте первого варианта осуществления R¹ выбран из группы, состоящей из H и F;

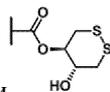
R² выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C=CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ и NHCH₃;

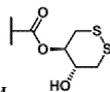
R³ выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C=CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ и NHCH₃;

R⁴ выбран из группы, состоящей из H и F;

R⁵ выбран из группы, состоящей из H и Cl;

каждый R^6 независимо выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_4 алкила и C_1 - C_4 галогеналкила;
 X^1 представляет собой $C(O)$;
 X^2 представляет собой CHR^8CHR^8 ;



X^3 выбран из группы, состоящей из $COOH$, $COOC(CH_3)_3$ и  ; и
каждый R^8 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_4 алкила.

Во втором аспекте первого варианта осуществления R^1 выбран из группы, состоящей из H и F;
 R^2 выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C=CH$,
OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 и $NHCH_3$;

R^3 выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C=CH$,
OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 и $NHCH_3$;

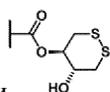
R^4 выбран из группы, состоящей из H и F;

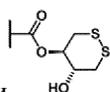
R^5 выбран из группы, состоящей из H и C1;

каждый R^6 независимо выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_4 алкила и C_1 - C_4 галогеналкила;

X^1 представляет собой $C(O)$;

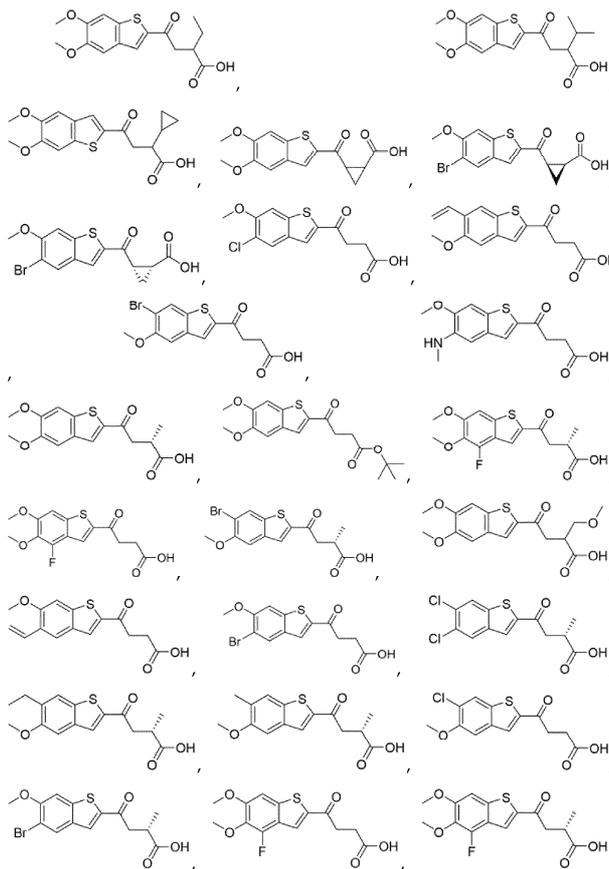
X^2 представляет собой CHR^8CHR^8 ;

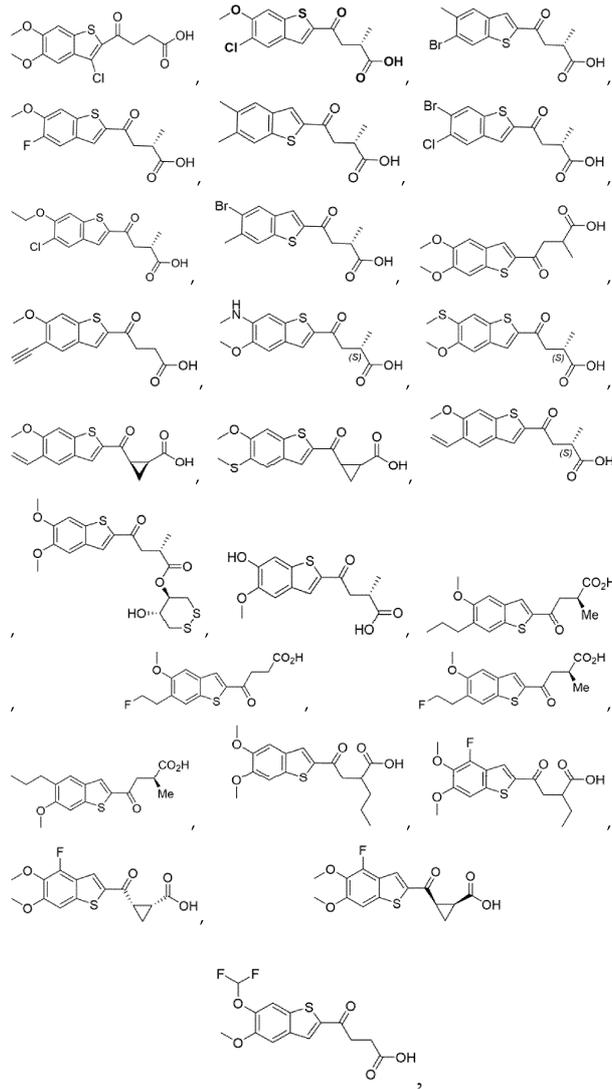


X^3 выбран из группы, состоящей из $COOH$, $COOC(CH_3)_3$ и  ; и

$2R^8$ взяты вместе, наряду с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-членного конденсированного кольца.

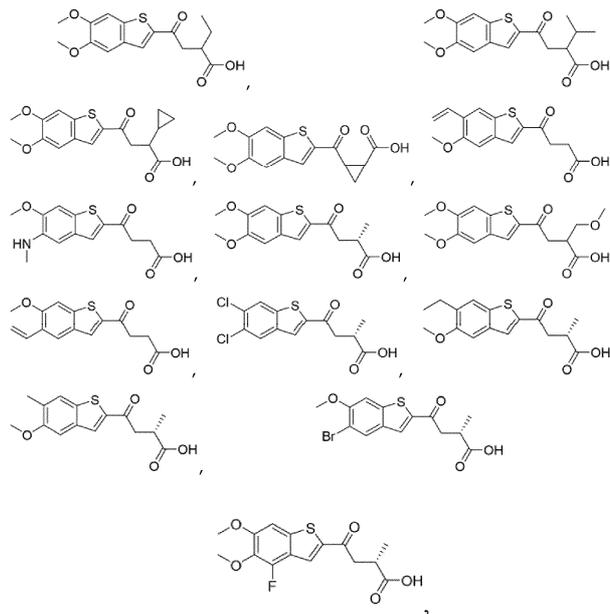
В третьем аспекте первого варианта осуществления соединение первого аспекта R^3 выбрано из группы, состоящей из





или его фармацевтически приемлемой соли.

В четвертом аспекте первого варианта осуществления соединение третьего аспекта выбрано из группы, состоящей из



или его фармацевтически приемлемой соли.

Пятый аспект первого варианта осуществления относится к применению соединения по любому из первого по четвертый аспект или его фармацевтически приемлемой соли в терапии.

Шестой аспект первого варианта осуществления относится к фармацевтической композиции, причем указанная фармацевтическая композиция содержит (а) соединение в соответствии с общей формулой (Ia') приведенного выше первого варианта осуществления или описанных выше аспектов с первого по четвертый или его фармацевтически приемлемую соль; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

Седьмой аспект первого варианта осуществления относится к применению соединения по любому из первого по четвертый аспект или его фармацевтически приемлемой соли для лечения нарушения клеточной пролиферации у субъекта.

Восьмой аспект первого варианта осуществления относится к применению согласно седьмому аспекту, где нарушение клеточной пролиферации представляет собой рак.

Девятый аспект первого варианта осуществления относится к применению фармацевтической композиции согласно шестому аспекту для лечения нарушения клеточной пролиферации у субъекта.

Десятый аспект первого варианта осуществления относится к применению согласно девятому аспекту, где нарушение клеточной пролиферации представляет собой рак.

В вариантах осуществления соединения, представленного выше, следует понимать, что каждый вариант осуществления может быть объединен с одним или несколькими другими вариантами осуществления в той степени, в которой такое объединение обеспечивает стабильное соединение и согласуется с описанием вариантов осуществления. Кроме того, следует понимать, что варианты осуществления композиций и способов, представленные выше, включают в себя все варианты осуществления соединений, в том числе такие варианты осуществления, которые являются результатом комбинаций вариантов осуществления.

Термин "субъект" (в качестве альтернативы - "пациент"), используемый в настоящем документе, относится к млекопитающему, которое является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Млекопитающее может быть мужского или женского рода. Млекопитающее может быть одним или более, выбранным из группы, состоящей из людей, бычьих (например, коров), свиных (например, свиней), овечьих (например, овец), козьих (например, коз), лошадиных (например, лошадей), псовых (например, домашних собак), кошачьих (например, домашних кошек), зайцеобразных (кроликов), грызунов (например, крыс или мышей), *Procyon lotor* (например, енотов). В частных вариантах осуществления субъектом является человек.

Используемый в настоящем описании термин "иммунный ответ" относится к любому одному или более из следующего: специфическому иммунному ответу, неспецифическому иммунному ответу, к обоим специфическому и неспецифическому иммунным ответам, врожденному ответу, первичному иммунному ответу, приобретенному иммунитету, вторичному иммунному ответу, иммунному ответу памяти, активации иммунных клеток, пролиферации иммунных клеток, дифференциации иммунных клеток и экспрессии цитокинов.

Соединения.

Термин "алкил" относится к одновалентному насыщенному алифатическому углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему число атомов углерода в заданном диапазоне. Так, например, "C₁₋₆ алкил" (или "C₁-C₆ алкил") относится к любому из гексильных и пентильных алкилизомеров, а также к н-, изо-, втор- и трет-бутилу, н- и изопропилу, этилу и метилу. В качестве другого примера "C₁₋₄ алкил" относится к н-, изо-, втор- и трет-бутилу, н- и изопропилу, этилу и метилу.

Используемый в настоящем документе термин "алкилен" относится к двухвалентному насыщенному алифатическому углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему число атомов углерода в заданном диапазоне.

Используемый в настоящем документе термин "алкенил" относится к одновалентному ненасыщенному алифатическому углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему число атомов углерода в заданном диапазоне и содержащему одну или более двойных связей.

Используемый здесь термин "алкенилен" относится к двухвалентному ненасыщенному алифатическому углеводородному радикалу с прямой цепью, имеющему число атомов углерода в указанном диапазоне и включающему одну или более двойных связей.

Используемый в настоящем документе термин "алкинил" относится к одновалентному ненасыщенному алифатическому углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему число атомов углерода в заданном диапазоне и содержащему одну или более тройных связей.

Используемый в настоящем документе термин "алкинилен" относится к двухвалентному ненасыщенному алифатическому углеводородному радикалу с прямой цепью, имеющему число атомов углерода в заданном диапазоне и включающему одну или более тройных связей.

Термин "галоген" (или "гало") относится к фтору, хлору, бром и йоду (в качестве альтернативы обозначаемым фтор, хлор, бром и иод или F, Cl, Br и I).

Термин "галогеналкил" относится к определенной выше алкильной группе, в которой один или более атомов водорода замещены галогеном. Так, например, "C₁₋₆ галогеналкил" (или "C₁-C₆ галогеналкил") относится к описанной выше C₁-C₆ линейной или разветвленной алкильной группе с одним или более галогеновыми заместителями. Термин "фторалкил" имеет аналогичное значение, за исключением того, что галогеновые заместители ограничены фтором. Подходящие фторалкилы включают ряд (CH₂)₀₋₄CF₃

(т.е. трифторметил, 2,2,2-трифторэтил, 3,3,3-трифтор-н-пропил, и т.д.).

Используемый в настоящем документе термин "галогеналкенил" относится к определенной выше алкенильной группе, в которой один или более атомов водорода замещены галогеном.

Используемый в настоящем документе термин "галогеналкинил" относится к определенной выше алкинильной группе, в которой один или более атомов водорода замещены галогеном.

Используемый в настоящем документе термин "алкокси", один или в комбинации, включает в себя алкильную группу, связанную с соединительным атомом кислорода. Термин "алкокси" также включает в себя группы простого алкилового эфира, где термин "алкил" является таким, как определено выше, и термин "простой эфир" означает две алкильные группы с атомом кислорода между ними. Примеры подходящих алкоксигрупп включают метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, метоксиметан (также называется "простой диметиловый эфир") и метоксиэтан (также называется "простой этилметиловый эфир").

Используемый здесь термин "циклоалкил" относится к насыщенному углеводороду, содержащему одно кольцо, имеющее заданное число атомов углерода. Примеры циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

Используемый в настоящем документе термин "гетероцикл", "гетероциклил" или "гетероциклический" представляет собой стабильное 3-6-членное моноциклическое кольцо, которое является насыщенным или ненасыщенным и которое состоит из атомов углерода и одного-двух гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S. Гетероциклическое кольцо может быть присоединено к любому гетероатому или атому углерода, что приводит к созданию стабильной структуры. Термин включает гетероарильные фрагменты. Примеры таких гетероциклических элементов включают, без ограничения, азепинил, бензимидазоллил, бензизоксазоллил, бензофуразанил, бензопиранил, бензотиопиранил, бензофурил, бензотиазолил, бензотиенил, бензоксазоллил, хроманил, циннолинил, дигидробензофурил, дигидробензотиенил, дигидробензотиопиранил, дигидробензотиопиранилсульфон, 1,3-диоксоланил, фурил, имидазоллидинил, имидазолинил, имидазолил, индолинил, индолил, изохроманил, изоиндолинил, изохинолинил, изотиазолил, изотиазолидинил, морфолинил, нафтиридилил, оксадиазолил, 2-оксоазепинил, оксазолил, 2-оксопиперазинил, 2-оксопиперидинил, 2-оксопирролидинил, пиперидил, пиперазинил, пиридил, пирозинил, пирозолидинил, пирозолил, пиридазинил, пиримидинил, пирролидинил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, хиноксалинил, тетрагидрофурил, тетрагидроизохинолинил, тетрагидрохинолинил, тиаморфолинил, тиаморфолинилсульфоксид, тиазолил, тиазолинил, тиенофурил, тиенотиенил, триазолил и тиенил.

Используемый в настоящем документе термин "конденсированное кольцо" относится к циклической группе, образованной заместителями на отдельных атомах в неразветвленном или разветвленном алкане, или к циклической группе, образованной заместителями на отдельных атомах в другом кольце.

Используемый в настоящем документе термин "спироцикл" или "спироциклическое кольцо" относится к боковой циклической группе, образованной заместителями на одном атоме.

Если прямо не указано иное, все приведенные здесь диапазоны являются включающими, т.е. диапазон включает в себя значения верхнего и нижнего пределов диапазона, а также все значения между ними. В качестве примера диапазоны температур, процентов, диапазоны эквивалентов и тому подобное, описанные в настоящей заявке, включают верхний и нижний пределы диапазона и любое значение в континууме между ними. Числовые значения, приведенные в настоящем описании, и использование термина "примерно" могут включать изменения ± 1 , ± 2 , ± 3 , ± 4 , ± 5 , ± 10 , ± 15 и $\pm 20\%$ и их числовые эквиваленты.

Используемый в настоящем описании термин "один или более" элемент включает один элемент, выбранный из списка, а также смеси двух или более элементов, выбранных из списка.

В соединениях общей формулы (Ia') и фармацевтически приемлемых солях вышеуказанного атомы могут присутствовать в своем естественном изотопном составе или один или более атомов могут быть искусственно обогащены конкретным изотопом, имеющим такое же атомное число, но другую атомную массу или массовое число, которое отличается от атомной массы или массового числа, преимущественно встречающегося в природе. Настоящее изобретение подразумевает включение всех подходящих изотопных вариантов соединений общей формулы (Ia') и фармацевтически приемлемых солей вышеуказанного. Например, разные изотопные формы водорода (H) включают протий (^1H), дейтерий (^2H) и тритий (^3H). Протий является преобладающим изотопом водорода, встречающимся в природе. Обогащение дейтерием может обеспечить определенные терапевтические преимущества, такие как увеличение периода полувыведения *in vivo* или уменьшение требований к дозировке, или может обеспечить соединение, подходящее в качестве стандарта для характеристики биологических образцов. Изотопно-обогащенные соединения общей формулы (Ia') и фармацевтически приемлемые соли вышеуказанного могут быть получены без чрезмерного экспериментирования обычными методами, хорошо известными специалистам в данной области техники, или способами, аналогичными тем, которые описаны в приведенных здесь схемах и примерах, с использованием подходящих изотопно-обогащенных реагентов и/или промежуточных соединений.

В частных вариантах осуществления соединений общей формулы (Ia') и фармацевтически приемлемых солей вышеуказанного соединения являются изотопно-обогащенными дейтерием. В аспектах этих

вариантов осуществления один или более из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^8 и R^9 могут включать дейтерий.

Как показано в общих структурных формулах и структурах конкретных соединений, приведенных в настоящем описании, прямая линия в хиральном центре включает оба (R) и (S)-стереоизомера и их смеси. Также, если не указано иное (например, 100%-ное очищенное соединение), ссылка на конкретную стереохимию в определенном положении определяет соединение, имеющее указанную стереохимию, но не исключает наличия стереоизомеров, имеющих другую стереохимию в указанном положении.

Перечисление или описание конкретного соединения в формуле изобретения (т.е. вида соединений) без конкретного обозначения стереоконфигурации или с таким обозначением для менее чем всех хиральных центров означает, что он охватывает для таких необозначенных хиральных центров рацемат, рацемические смеси, каждый индивидуальный энантиомер, диастереоизомерную смесь и каждый индивидуальный диастереомер соединения, где такие формы возможны из-за присутствия одного или более асимметричных центров. Разделение смеси стереоизомеров может быть выполнено на промежуточной стадии во время синтеза соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемой соли вышеуказанного, или может быть выполнено после получения конечного рацемического продукта. Абсолютная стереохимия может быть определена с помощью рентгеновской кристаллографии кристаллических продуктов или кристаллических промежуточных соединений, которые при необходимости подвергают дериватизации реагентом, содержащим стереогенный центр известной конфигурации. В качестве альтернативы абсолютная стереохимия может быть определена с помощью спектроскопического анализа вибрационного кругового дихроизма (VCD). Настоящее изобретение включает все такие изомеры и их смеси.

Изобретение включает все возможные энантиомеры и диастереомеры и смеси двух или более стереоизомеров, например смеси энантиомеров и/или диастереомеров, во всех соотношениях. Таким образом, энантиомеры являются объектом изобретения в энантиомерно чистой форме, как в форме левовращающих, так и правовращающих антиподов, в форме рацематов и в форме смесей двух энантиомеров во всех соотношениях. В случае цис/транс-изомерии изобретение включает как цис-форму, так и транс-форму, а также смеси этих форм во всех соотношениях. Получение индивидуальных стереоизомеров можно осуществить при необходимости с помощью разделения смеси обычными способами, например с помощью хроматографии или кристаллизации, с помощью использования стереохимически однородных исходных материалов в синтезе, или используя стереоселективный синтез. Необязательно дериватизацию можно провести перед разделением стереоизомеров. Разделение смеси стереоизомеров может быть выполнено на промежуточной стадии во время синтеза соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемой соли вышеуказанного или может быть выполнено после получения конечного рацемического продукта. Абсолютная стереохимия может быть определена с помощью рентгеновской кристаллографии кристаллических продуктов или кристаллических промежуточных соединений, которые при необходимости подвергают дериватизации реагентом, содержащим стереогенный центр известной конфигурации. Если не указан конкретный изомер, соль, сольват (включая гидраты) или сольватированная соль такого рацемата, энантиомера или диастереомера, настоящее изобретение включает все такие изомеры, а также соли, сольваты (включая гидраты) и сольватированные соли таких рацематов, энантиомеров, диастереомеров и их смеси.

Термин "соединение" относится к соединению и в некоторых вариантах осуществления в той степени, до которой они являются стабильными, к любому его гидрату или сольвату. Гидрат представляет собой соединение, образующее комплекс с водой, а сольват представляет собой соединение, образующее комплекс с растворителем, который может быть органическим растворителем или неорганическим растворителем.

"Стабильным" соединением является соединение, которое может быть получено и выделено, и структура и свойства которого остаются или могут быть сохранены, по существу, неизменными в течение периода времени, достаточного для использования соединения в целях, описанных в данном документе (например, для терапевтического введения субъекту). Соединения настоящего изобретения ограничены стабильными соединениями, охватываемыми общей формулой (Ia') или их фармацевтически приемлемыми солями.

Соли.

Как указано выше, соединения настоящего изобретения можно применять в форме фармацевтически приемлемых солей. Специалистам в данной области техники будут понятны случаи, когда соединения по изобретению могут образовывать соли. Примеры таких соединений описаны в данном документе путем ссылки на возможные соли. Такая ссылка предназначена только для иллюстрации. Фармацевтически приемлемые соли могут быть использованы с соединениями для лечения пациентов. Однако не являющиеся фармацевтическими соли могут быть полезны при получении промежуточных соединений.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли (включая внутреннюю соль, такую как цвиттер-ион), которая обладает эффективностью, аналогичной исходному соединению, и которая не является биологически или иным образом нежелательной (например, не является ни токсичной, ни иным образом опасной для реципиента). Таким образом, вариант осуществления изобретения относится к фармацевтически приемлемым солям соединений по изобретению. Термин "соль (соли)", используемый в

данном документе, обозначает любое из следующего: кислые соли, образованные неорганическими и/или органическими кислотами, а также основные соли, образованные неорганическими и/или органическими основаниями. Соли соединений по изобретению могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники, например путем взаимодействия соединения по изобретению с некоторым количеством кислоты или основания, таким как эквивалентное количество, в такой среде, в которой соль осаждается, или в водной среде с последующей лиофилизацией.

Примеры кислотно-аддитивных солей включают ацетаты, аскорбаты, бензоаты, бензолсульфонаты, бисульфаты, бораты, бутираты, цитраты, камфораты, камфорсульфонаты, фумараты, гидрохлориды, гидробромиды, гидройодиды, лактаты, малеаты, метансульфонаты ("мезилаты"), нафталинсульфонаты, нитраты, оксалаты, фосфаты, пропионаты, салицилаты, сукцинаты, сульфаты, тартраты, тиоцианаты, толуолсульфонаты (также известные как тозилаты) и тому подобное. Подходящие соли включают кислотно-аддитивные соли, которые могут, например, быть образованы путем смешивания раствора соединения с раствором фармацевтически приемлемой кислоты, такой как соляная кислота, серная кислота, уксусная кислота, трифторуксусная кислота или бензойная кислота. Кроме того, кислоты, которые обычно считаются подходящими для образования фармацевтически приемлемых солей из основных фармацевтических соединений, обсуждаются, например, P. Stahl et al., Camille G. (eds.), Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge et al., Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66(1) 1-19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201-217; Anderson et al., The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, New York; и в The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D.C. на соответствующем веб-сайте). Эти документы включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Примеры основных солей включают аммониевые соли, соли щелочных металлов, например соли натрия, лития и калия, соли щелочноземельных металлов, например кальциевые и магниевые соли, соли с органическими основаниями (например, органическими аминами), как например, дициклогексиламин, трет-бутиламин, холин, и соли с аминокислотами, как например, аргинин, лизин и тому подобное. Основные азотсодержащие группы могут быть кватернизированы агентами, такими как низшие алкилгалогениды (например, метил, этил и бутилхлориды, бромиды и йодиды), диалкилсульфаты (например, диметил, диэтил и дибутилсульфаты), длинноцепочечные галогениды (например, децил, лаурил и стеарилхлориды, бромиды и йодиды), аралкилгалогениды (например, бензил и феноэтилбромиды) и другие. Соединения, содержащие кислотный фрагмент, могут быть смешаны с подходящими фармацевтически приемлемыми солями для получения, например, солей щелочных металлов (например, солей натрия или калия), солей щелочноземельных металлов (например, солей кальция или магния) и солей, образованных подходящими органическими лигандами, такими как соли четвертичного аммония. Кроме того, в случае присутствия кислотной (-COOH) или спиртовой группы фармацевтически приемлемые сложные эфиры могут использоваться для изменения характеристик растворимости или гидролиза соединения.

Подразумевается, что все такие кислотные соли и основные соли являются фармацевтически приемлемыми солями в пределах объема изобретения, и все кислотные и основные соли считаются эквивалентными свободным формам соответствующих соединений для целей изобретения.

Кроме того, когда соединение по изобретению содержит как основной фрагмент, такой как, без ограничения, алифатический первичный, вторичный, третичный или циклический амин, ароматический или гетероариламин, пиридин или имидазол, так и кислотный фрагмент, такой как, без ограничения, тетразол или карбоновая кислота, - могут быть получены цвиттерионы ("внутренние соли"), которые включаются в термин "соль (соли)", используемый в настоящем документе. Понятно, что некоторые соединения по изобретению могут существовать в цвиттерионной форме, имеющей как анионные, так и катионные центры в одном и том же соединении и суммарный нейтральный заряд. Такие цвиттерионы включены в объем изобретения.

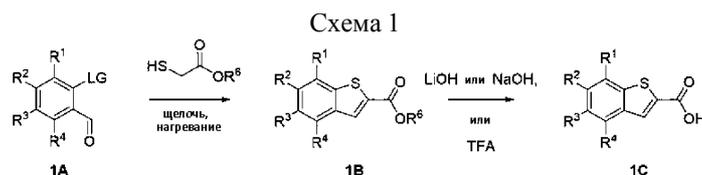
Способы получения соединений.

Несколько способов получения (Ia') и фармацевтически приемлемых солей вышеуказанного описано в следующих ниже схемах и примерах. Исходные материалы и промежуточные продукты приобретались из коммерческих источников, изготавливались по известным методикам или проиллюстрированы иным образом. В некоторых случаях порядок проведения стадий в схемах реакций может быть изменен для облегчения реакции или для предотвращения образования нежелательных продуктов реакции.

В следующих ниже способах и схемах LG означает удаляемую группу, которая может быть галогенидной или трифлатной группой. Переменные R¹, R², R³, R⁴, R⁶, R⁸ и X² имеют такое же значение, как было указано выше.

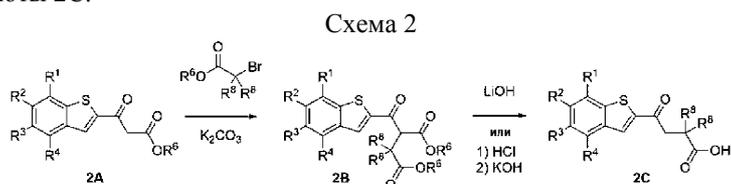
Способ 1.

Бензо[b]тиофен-2-карбоновые кислоты и их фармацевтически приемлемые соли обычно получают из ортогалогенбензальдегидов. Последовательность начинается с обработки сложным эфиром альфатюуксусной кислоты в щелочных условиях. Сложный эфир в полученном соединении расщепляли до карбоновой кислоты в щелочных условиях с получением желаемой замещенной бензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты 1C.



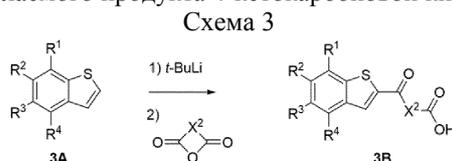
Способ 2.

Другой способ получения бензо[*b*]тиофен-2-карбоновых кислот и их фармацевтически приемлемых солей подробно представлен на схеме 2. Последовательность начинается с бензо[*b*]тиофена, замещенного в положении 2 соответствующей 1,3-дикарбонильной группой, такой как сложный бета-кетозфир. Он реагировал со сложным альфа-галогенэфиром в щелочных условиях, давая замещение в положении 2 алкильной цепи. Затем оба сложных эфира гидролизовали в кислых или щелочных условиях; при дальнейшем воздействии щелочных условий карбоновая кислота, соответствующая сложному эфиру в исходном материале, подвергалась декарбоксилированию с получением желаемой бензо[*b*]тиофенкетокислоты 2С.



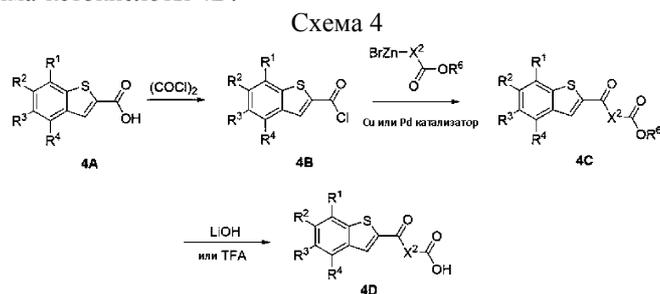
Способ 3.

Другой способ получения бензо[*b*]тиофен-2-карбоновых кислот и их фармацевтически приемлемых солей подробно представлен на схеме 3. Последовательность начинается с бензо[*b*]тиофена без замещения в положении 2. Его обрабатывали трет-бутиллитием с последующим добавлением ангидрида циклической кислоты с получением желаемого продукта 4-кетокрбоновой кислоты 3В.



Способ 4.

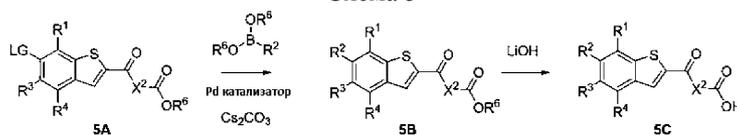
Другой способ получения бензо[*b*]тиофен-2-карбоновых кислот и их фармацевтически приемлемых солей подробно представлен на схеме 4. Последовательность начинается с бензо[*b*]тиофена, замещенного карбоновой кислотой в положении 2. Его обрабатывали оксалилхлоридом/дихлорметаном. Полученный хлорангидрид кислоты вступал в реакцию с алкилцинковым реагентом, обычно содержащим сложный эфир, с использованием переходного металла, такого как медь или палладий, для опосредования связывания. Затем сложный эфир расщепляли в основных или кислотных условиях с получением желаемой бензо[*b*]тиофен-гамма-кетокислоты 4D.



Способ 5.

Другой способ получения бензо[*b*]тиофен-2-карбоновых кислот и их фармацевтически приемлемых солей подробно представлен на схеме 5. Последовательность начинается с бензо[*b*]тиофена, замещенного в положении 2 сложным гамма-кетозфиром и галогенидом или трифлатом на бензо[*b*]тиофене. Его обрабатывали сложным бороновым эфиром, кислотой или трифторборатной солью с палладиевым катализатором в водных щелочных условиях. Затем сложный эфир в полученном соединении расщепляли до карбоновой кислоты в щелочных условиях с получением желаемого замещенного бензо[*b*]тиофена 5С. Следующая схема показывает введение заместителя R², но этот же общий способ замещения можно получить с определенными R³ заместителями, а также при использовании соответствующего субстрата с соответствующим образом размещенной LG.

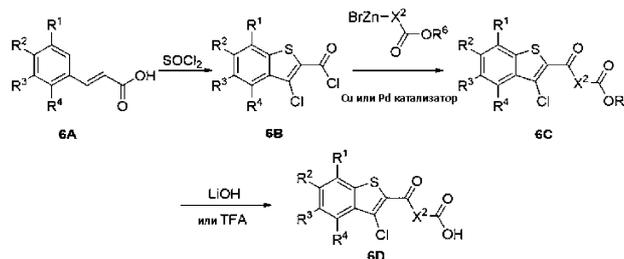
Схема 5



Способ 6.

Другой способ получения бензо[*b*]тиофен-2-карбоновых кислот и их фармацевтически приемлемых солей включает циклизацию коричной кислоты в присутствии тионилхлорида. Полученный хлорангидрид кислоты вступал в реакцию с алкилцинковым реагентом, обычно содержащим сложный эфир, с использованием переходного металла, такого как медь или палладий, для опосредования связывания. Затем сложный эфир расщепляли в основных или кислотных условиях с получением желаемой бензо[*b*]тиофен-гамма-кетокислоты 6D.

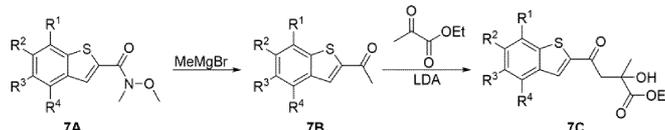
Схема 6



Способ 7.

Другой способ получения бензо[*b*]тиофен-2-карбоновых кислот и их фармацевтически приемлемых солей подробно представлен на схеме 7. Последовательность начинается с реакции Гриньяра с амидом Вайнрейба 7A с получением метилкетона 7B. Депротонирование кетона с помощью LDA с последующим добавлением этилпирувата дает 7C.

Схема 7



Способы использования.

Описанные здесь соединения, имеющие терапевтические применения, такие как соединения общей формулы (1a') соединения примеров 1-54 и фармацевтически приемлемые соли вышеуказанного, могут вводиться пациенту с целью индуцирования иммунного ответа, индуцирования выработки STING-зависимых цитокинов и/или индуцирования противоопухолевой активности. Термин "введение" и его варианты (например, "вводить" соединение) означает предоставление соединения индивидууму, нуждающемуся в лечении. Когда соединение предоставляется в сочетании с одним или более дополнительными активными агентами (например, противовирусными агентами, подходящими для лечения ВИЧ-инфекции, или противоопухолевыми агентами для лечения рака), "введение" и его варианты следует понимать, как включающие одновременное и последовательное предоставление соединения или соли и других агентов.

Описанные в настоящем документе соединения могут быть агонистами STING. Эти соединения потенциально полезны для лечения заболеваний или нарушений, включая, без ограничения, нарушения клеточной пролиферации. Нарушения клеточной пролиферации включают, без ограничения, рак, доброкачественный папилломатоз, гестационные трофобластические заболевания и доброкачественные неопластические заболевания, такие как кожная папиллома (бородавка) и генитальная папиллома.

В конкретных вариантах осуществления заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представляет собой нарушение клеточной пролиферации. В некоторых вариантах осуществления нарушение клеточной пролиферации представляет собой рак. В частных вариантах осуществления рак выбран из рака головного и спинного мозга, рака головы и шеи, лейкоза и рака крови, рака кожи, рака репродуктивной системы, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени и желчных путей, рака почек и мочевого пузыря, рака костей, рака легких, злокачественной мезотелиомы, сарком, лимфом, рака желез, рака щитовидной железы, опухолей сердца, эмбрионально-клеточных опухолей, злокачественных нейроэндокринных (карциноидных) опухолей, рака среднего отдела желудочно-кишечного тракта и рака с неизвестной первичной локализацией (т.е. раковых заболеваний, при которых обнаружен метастазировавший рак, но локализация исходного рака неизвестна). В частных вариантах осуществления рак присутствует у взрослого пациента; в дополнительных вариантах осуществления рак присутствует у педиатрического пациента. В частных вариантах осуществления рак связан со СПИДом.

В конкретных вариантах осуществления рак выбран из рака головного и спинного мозга. В частных

вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из анапластических астроцитом, глиобластом, астроцитом и эстезионейробластом (также известных как обонятельные бластомы). В частных вариантах осуществления рак головного мозга выбирают из группы, состоящей из астроцитарной опухоли (например, пилоцитарной астроцитомы, субэпендимальной гигантоклеточной астроцитомы, диффузной астроцитомы, плеоморфной ксаноастроцитомы, анапластической астроцитомы, астроцитомы, гигантоклеточной глиобластомы, глиобластомы, вторичной глиобластомы, первичной глиобластомы у взрослых и педиатрической первичной глиобластомы), олигодендроглиальной опухоли (например, олигодендроглиомы и анапластической олигодендроглиомы), олигоастроцитарной опухоли (например, олигоастроцитомы и анапластической олигоастроцитомы), эпендимомы (например, миксопапиллярной эпендимомы и анапластической эпендимомы); медуллобластомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, шванномы, менингиомы, атипичной менингиомы, анапластической менингиомы, аденомы гипофиза, глиомы ствола головного мозга, мозжечковой астроцитомы, церебральной астроцитомы/злокачественной глиомы, глиомы зрительного пути и гипоталамуса и первичной лимфомы центральной нервной системы. В конкретных случаях этих вариантов осуществления рак головного мозга выбирают из группы, состоящей из глиомы, мультиформной глиобластомы, параганглиомы и супратенториальных первичных нейроэктодермальных опухолей (sPNET).

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из рака головы и шеи, в том числе рака носоглотки, рака носовой полости и околоносовой пазухи, гипофарингеального рака, рака полости рта (например, сквамозно-клеточных карцином, лимфом и сарком), рака губ, орофарингеального рака, рака слюнных желез, рака гортани (например, сквамозно-клеточных карцином гортани, рабдомиосарком) и рака глаза или глазного рака. В частных вариантах осуществления глазной рак выбирают из группы, состоящей из внутриглазной меланомы и ретинобластомы.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из лейкемии и рака крови. В частных вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из миелопролиферативных новообразований, миелодиспластических синдромов, миелодиспластических/миелопролиферативных новообразований, острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), хронического миелолейкоза (CML), миелопролиферативного новообразования (MPN), пост-MPN AML, пост-MDS AML, del(5q)-ассоциированного MDS высокого риска или AML, хронического миелогенного лейкоза в бластной фазе, ангиоиммунобластной лимфомы, острого лимфобластного лейкоза, гистиоцитоза из клеток Лангерганса, волосатоклеточного лейкоза и новообразований плазматических клеток, в том числе плазмоцитомы и множественных миелом. Упомянутые здесь лейкозы могут быть острыми или хроническими.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из рака кожи. В частных вариантах осуществления рак кожи выбирают из группы, состоящей из меланомы, сквамозно-клеточного рака и рака базальных клеток.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из рака репродуктивной системы. В частных вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из рака молочной железы, рака шейки матки, рака влагалища, рака яичников, рака предстательной железы, рака полового члена и рака яичка. В конкретных случаях этих вариантов осуществления рак представляет собой рак молочной железы, выбранный из группы, состоящей из карцином протоков и филоидных опухолей. В конкретных случаях этих вариантов осуществления рак молочной железы может представлять собой рак молочной железы у мужчин или рак молочной железы у женщин. В конкретных случаях этих вариантов осуществления рак представляет собой рак шейки матки, выбранный из группы, состоящей из сквамозно-клеточных карцином и аденокарцином. В конкретных случаях этих вариантов осуществления рак представляет собой рак яичников, выбранный из группы, состоящей из эпителиальных раков.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из раковых заболеваний желудочно-кишечной системы. В частных вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из раков пищевода, раков желудочно-кишечного тракта (также известных как рак желудка), желудочно-кишечных карциноидных опухолей, раков поджелудочной железы, раков желчного пузыря, колоректальных раков и анальных раков. В случаях этих вариантов осуществления рак выбирают из группы, состоящей из сквамозно-клеточных карцином пищевода, аденокарцином пищевода, аденокарцином желудка, желудочно-кишечных карциноидных опухолей, желудочно-кишечных стромальных опухолей, лимфом желудка, желудочно-кишечных лимфом, солидно-псевдопапиллярных опухолей поджелудочной железы, панкреатобластомы, опухолей островковых клеток, карцином поджелудочной железы, включающих ацинозно-клеточные карциномы и протоковые аденокарциномы, аденокарцином желчного пузыря, колоректальных аденокарцином и анальных сквамозно-клеточных карцином.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из раков печени и желчных путей. В частных вариантах осуществления рак представляет собой рак печени (также известный как гепатоцеллюлярная карцинома). В частных вариантах осуществления рак представляет собой рак желчных путей (также известный как холангиокарцинома); в случаях таких вариантов осуществления рак желчных путей выбирают из группы, состоящей из внутривнутрипеченочной холангиокарциномы и внепеченочной холангиокарциномы.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из раков почки и мочевого пузыря. В част-

ных вариантах осуществления рак представляет собой рак почки, выбранный из группы, состоящей из почечно-клеточного рака, опухолей Вильмса и переходно-клеточного рака. В частных вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, выбранный из группы, состоящей из уротелиальной карциномы (переходно-клеточной карциномы), сквамозно-клеточных карцином и аденокарцином.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из раковых заболеваний костей. В частных вариантах осуществления рак костей выбирают из группы, состоящей из остеосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости, саркомы Юинга, хордомы (рака кости вдоль позвоночника).

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из рака легких. В частных вариантах осуществления рак легких выбирают из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, бронхиальных опухолей и плевроролечных бластом.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из злокачественной мезотелиомы. В частных вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из эпителиальной мезотелиомы и саркоматоидов.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из сарком. В частных вариантах осуществления саркому выбирают из группы, состоящей из центральной хондросаркомы, центральной и периостальной хондромы, фибросаркомы, светлоклеточной саркомы сухожильного влагалища и саркомы Капоши.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из лимфом. В частных вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из лимфомы Ходжкина (например, клеток Рида-Штернберга), неходжкинской лимфомы (например, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, грибовидного микоза, синдрома Сезари, первичной лимфомы центральной нервной системы), кожных Т-клеточных лимфом, первичных лимфом центральной нервной системы.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из рака желез. В частных вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из аденокортикального рака (также известного как аденокортикальная карцинома или рак коры надпочечников), феохромоцитом, параганглиом, опухолей гипофиза, тимомы и тимических карцином.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из рака щитовидной железы. В частных вариантах осуществления рак щитовидной железы выбирают из группы, состоящей из медуллярных карцином щитовидной железы, папиллярных карцином щитовидной железы и фолликулярных карцином щитовидной железы.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из эмбрионально-клеточных опухолей. В частных вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из злокачественных экстракраниальных эмбрионально-клеточных опухолей и злокачественных экстрагонадных эмбрионально-клеточных опухолей. В конкретных случаях этих вариантов осуществления злокачественные экстрагонадные эмбрионально-клеточные опухоли выбирают из группы, состоящей из несемином и семином.

В конкретных вариантах осуществления рак выбирают из опухолей сердца. В частных вариантах осуществления опухоль сердца выбирают из группы, состоящей из злокачественной тератомы, лимфомы, рабдомиосаркомы, ангиосаркомы, хондросаркомы, младенческой фибросаркомы и синовиальной саркомы.

В конкретных вариантах осуществления нарушение клеточной пролиферации выбирают из доброкачественного папилломатоза, доброкачественных неопластических заболеваний и гестационных трофобластических заболеваний. В частных вариантах осуществления доброкачественное неопластическое заболевание выбирают из кожной папилломы (бородавки) и генитальной папилломы. В частных вариантах осуществления гестационное трофобластическое заболевание выбирают из группы, состоящей из пузырного заноса и гестационных трофобластических новообразований (например, инвазивных пузырных заносов, хориокарцином, плацентарных трофобластических опухолей и эпителиоидных трофобластических опухолей).

Используемые в настоящем документе термины "лечение" и "излечиваемый" относятся ко всем процессам, которые могут представлять собой замедление, прерывание, приостановку, контроль или прекращение заболевания или нарушения, описанного в данном документе. Эти термины не обязательно указывают на полное устранение всех симптомов заболевания или нарушения.

Термины "введение" и/или "введение соединения" следует понимать как включающие предоставление соединения, описанного в настоящей заявке, или его фармацевтически приемлемой соли и указанных выше композиций субъекту.

Количество соединения, вводимого субъекту, является достаточным для индуцирования иммунного ответа и/или индуцирования выработки STING-зависимых интерферонов I типа у субъекта. В варианте осуществления количество соединения может быть "эффективным количеством" или "терапевтически эффективным количеством", так что рассматриваемое соединение вводится в количестве, которое будет вызывать соответственно биологический или медицинский (т.е. предназначенный для лечения) ответ на уровне ткани, на системном уровне, у животного или человека, получения которого добивается исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Эффективное количество не обязательно определяется с учетом токсичности и безопасности, связанных с введением соединения.

Эффективное количество соединения может меняться в зависимости от конкретного выбранного соединения (например, с учетом активности, эффективности и/или периода полувыведения соединения); выбранного пути введения; подлежащего лечению состояния; тяжести подлежащего лечению состояния; возраста, размера, веса и физического состояния подлежащего лечению субъекта; истории болезни подлежащего лечению субъекта; продолжительности лечения; характера параллельной терапии; требуемого терапевтического эффекта; и аналогичных факторов, и обычно может быть определено квалифицированным специалистом.

Описанные в настоящей заявке соединения можно вводить любым подходящим способом, включая пероральное и парентеральное введение. Парентеральное введение обычно осуществляют путем инъекции или инфузии, что включает внутривенную, внутримышечную и подкожную инъекцию или инфузию.

Описанные в настоящей заявке соединения можно вводить однократно или в соответствии с режимом дозирования, при котором несколько доз вводят через различные промежутки времени в течение определенного периода времени. Например, дозы можно вводить один, два, три или четыре раза в день. Дозы можно вводить до тех пор, пока не будет достигнут требуемый терапевтический эффект, или в течение неограниченного промежутка времени для сохранения желаемого терапевтического эффекта. Подходящие схемы дозирования для описанного в настоящей заявке соединения зависят от фармакокинетических свойств этого соединения, таких как абсорбция, распределение и период полувыведения, которые могут быть определены квалифицированным специалистом. Кроме того, подходящие режимы дозирования, включая продолжительность таких режимов для введения описанных в настоящей заявке соединений, зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания или состояния, возраста и физического состояния подлежащего лечению субъекта, истории болезни подлежащего лечению субъекта, характера параллельной терапии, желаемого терапевтического эффекта и подобных факторов в пределах знаний и опыта квалифицированного специалиста. Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что подходящие режимы дозирования могут требовать корректировки с учетом реакции отдельного субъекта на режим дозирования или с течением времени, по мере изменения состояния отдельного субъекта. Типичные суточные дозы могут варьировать в зависимости от конкретного выбранного способа введения.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения предлагает способ лечения нарушения клеточной пролиферации, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемой соли вышеуказанного субъекту, нуждающемуся в лечении. В вариантах осуществления заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представляет собой нарушение клеточной пролиферации. В аспектах этих вариантов осуществления нарушение клеточной пролиферации представляет собой рак. В дополнительных аспектах этих вариантов осуществления рак выбирают из рака головного и спинного мозга, рака головы и шеи, лейкоза и рака крови, рака кожи, рака репродуктивной системы, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени и желчных путей, рака почек и мочевого пузыря, рака костей, рака легких, злокачественной мезотелиомы, сарком, лимфом, рака желез, рака щитовидной железы, опухолей сердца, эмбрионально-клеточных опухолей, злокачественных нейроэндокринных (карциноидных) опухолей, рака среднего отдела желудочно-кишечного тракта и рака с неизвестной первичной локализацией.

В одном варианте осуществления в настоящем документе описано применение соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемой соли вышеуказанного в терапии. Соединение можно использовать в способе индуцирования иммунного ответа и/или индуцирования выработки STING-зависимых интерферонов I типа у субъекта, такого как млекопитающее, нуждающегося в таком ингибировании, включающем введение субъекту эффективного количества соединения.

В одном варианте осуществления в настоящем документе описана фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно соединение общей формулы (Ia') или по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую соль вышеуказанного для использования в потенциальном лечении для индуцирования иммунного ответа и/или индуцирования выработки STING-зависимых интерферонов I типа.

В одном варианте осуществления в настоящем документе описано применение соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемой соли вышеуказанного для изготовления лекарственного средства с целью индуцирования иммунного ответа и/или индуцирования выработки STING-зависимых интерферонов I типа. В вариантах осуществления заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представляет собой нарушение клеточной пролиферации. В аспектах этих вариантов осуществления нарушение клеточной пролиферации представляет собой рак. В дополнительных аспектах этих вариантов осуществления рак выбирают из рака головного и спинного мозга, рака головы и шеи, лейкоза и рака крови, рака кожи, рака репродуктивной системы, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени и желчных путей, рака почек и мочевого пузыря, рака костей, рака легких, злокачественной мезотелиомы, сарком, лимфом, рака желез, рака щитовидной железы, опухолей сердца, эмбрионально-клеточных опухолей, злокачественных нейроэндокринных (карциноидных) опухолей, рака среднего отдела желудочно-кишечного тракта и рака с неизвестной первичной локализацией.

Композиции.

Используемый в настоящем документе термин "композиция" включает лекарственную форму, со-

державшую определенное соединение в определенном количестве, а также любую лекарственную форму, которую получают, прямо или опосредованно, в результате комбинации указанного соединения в определенном количестве. Подразумевается, что этот термин включает лекарственную форму, содержащую соединение общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемую соль вышеуказанного, и один или большее число фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Соответственно композиции по настоящему изобретению включают любую композицию, полученную путем смешивания соединения настоящего изобретения с одним или более фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентами. Под "фармацевтически приемлемым" подразумевается, что носители или эксципиенты совместимы с соединением, описанным в настоящем документе, а также с другими ингредиентами композиции.

С целью индуцирования иммунного ответа и/или индуцирования выработки STING-зависимых интерферонов I типа соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемые соли вышеуказанного можно вводить с помощью средств, которые обеспечивают контакт активного агента с участком воздействия этого агента. Соединения могут быть введены с помощью обычных средств, доступных для использования в сочетании с фармацевтическими веществами, либо в виде отдельных терапевтических агентов, либо в комбинации терапевтических агентов. Соединения могут быть введены отдельно, но обычно их вводят с фармацевтическим носителем, выбранным исходя из выбранного способа введения и стандартной фармацевтической практики.

В одном варианте осуществления в настоящем документе описана композиция, содержащая соединение общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемую соль вышеуказанного и один или большее число фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Композиция может быть приготовлена и упакована в объемную форму, из которой может быть извлечено эффективное количество соединения по изобретению и затем предоставлено субъекту, например, в виде порошка или сиропа. В качестве альтернативы композиция может быть приготовлена и упакована в виде стандартной лекарственной формы, в которой каждая физически дискретная единица содержит терапевтически эффективное количество соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемой соли вышеуказанного.

Описанные в настоящей заявке соединения и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель (наполнители), как правило, должны быть составлены в лекарственную форму, адаптированную для введения субъекту согласно требуемому пути введения. Например, лекарственные формы включают формы, адаптированные для (1) перорального введения, такие как таблетки, капсулы, капсуловидные таблетки, пилюли, пастилки, порошки, сиропы, эликсиры, суспензии, растворы, эмульсии, саше и крахмальные капсулы; и (2) парентерального введения, такие как стерильные растворы, суспензии и порошки для приготовления раствора. Подходящие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты будут варьировать в зависимости от конкретной выбранной лекарственной формы. Кроме того, подходящие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты могут быть выбраны с учетом определенной функции, которую они могут выполнять в композиции. Например, некоторые фармацевтически приемлемые носители или наполнители могут быть выбраны с учетом их способности облегчать получение однородных лекарственных форм. Некоторые фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты могут быть выбраны с учетом их способности облегчать получение стабильных лекарственных форм. Некоторые фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты могут быть выбраны с учетом их способности облегчать перенос или транспортировку описанного в настоящей заявке соединения после введения субъекту из одного органа или части тела в другой орган или другую часть тела. Некоторые фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты могут быть выбраны с учетом их способности улучшать соблюдение пациентом режима лечения.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают следующие типы эксципиентов: разбавители, лубриканты, связующие вещества, разрыхлители, наполнители, глиданты, гранулирующие агенты, агенты для нанесения покрытия, смачивающие агенты, растворители, соразтворители, суспендирующие агенты, эмульгаторы, подсластители, вкусовые добавки, маскирующие вкус вещества, красители, антикомкователи, увлажняющие агенты, хелатирующие агенты, пластификаторы, повышающие вязкость агенты, антиоксиданты, консерванты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества и буферные агенты.

Специалист обладает знаниями и навыками в данной области для выбора подходящих фармацевтически приемлемых носителей и эксципиентов в соответствующих количествах для использования в композициях изобретения. Кроме того, имеется ряд ресурсов, доступных квалифицированному специалисту, в которых описаны фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты и которые могут быть полезными при выборе подходящих фармацевтически приемлемых носителей и эксципиентов. Примеры включают Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited) и The Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press).

Композиции настоящего изобретения получают методами и способами, известными специалистам в данной области. Некоторые методы, обычно используемые в данной области, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company).

В одном варианте осуществления изобретение относится к твердой пероральной лекарственной

форме, такой как таблетка или капсула, содержащей терапевтически эффективное количество соединения общей формулы (Ia') или фармацевтически приемлемой соли вышеуказанного, и разбавитель или наполнитель. Подходящие разбавители и наполнители включают лактозу, сахарозу, декстрозу, маннит, сорбит, крахмал (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал и прежелатинизированный крахмал), целлюлозу и ее производные (например, микрокристаллическую целлюлозу), сульфат кальция и двухосновный фосфат кальция. Твердая пероральная лекарственная форма может дополнительно содержать связующее. Подходящие связующие включают крахмал (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал и прежелатинизированный крахмал), желатин, аравийскую камедь, альгинат натрия, альгиновую кислоту, трагакант, гуаровую камедь, повидон и целлюлозу и ее производные (например, микрокристаллическую целлюлозу). Твердая пероральная лекарственная форма может дополнительно содержать разрыхлитель. Подходящие разрыхлители включают кросповидон, натрийкрахмалгликолят, кроскармелозу, альгиновую кислоту и натрийкарбоксиметилцеллюлозу. Твердая пероральная лекарственная форма может дополнительно содержать лубрикант. Подходящие лубриканты включают стеариновую кислоту, стеарат магния, стеарат кальция и тальк.

Если необходимо, составы для дозированных форм для перорального введения могут быть микрокапсулированы. Композиция также может быть приготовлена для пролонгированного или замедленного высвобождения, например, путем покрытия или заливки материала в виде частиц полимерами, воском или тому подобным.

Описанные в настоящей заявке соединения также могут быть связаны с растворимыми полимерами в качестве целевых носителей лекарственного средства. Такие полимеры могут включать поливинилпирролидон, сополимер пирана, полигидроксипропилметакриламидфенол, полигидроксиэтиласпартамидфенол или полиэтиленоксидполилизин, замещенный остатками пальмитоила. Кроме того, соединения по изобретению могут быть связаны с классом биodeградируемых полимеров, применяемых для достижения контролируемого высвобождения лекарственного средства, например полимолочной кислотой, полиε-капролактоном, полигидроксимасляной кислотой, сложными полиортоэфирами, полиацеталами, полидигидропиранами, полицианакрилатами и сшитыми или амфипатическими блок-сополимерами гидрогелей.

В одном варианте осуществления изобретение относится к жидкой лекарственной форме для перорального введения. Жидкости для перорального введения, такие как растворы, сиропы и эликсиры, могут быть получены в единичной дозированной форме, такой что заданное количество содержит заранее определенное количество описанного в настоящей заявке соединения или его фармацевтически приемлемой соли. Сиропы могут быть получены растворением соединения по изобретению в подходящем образом ароматизированном водном растворе; эликсиры получают путем использования нетоксичного алкогольного носителя. Суспензии могут быть составлены путем диспергирования описанного в настоящей заявке соединения в нетоксичном носителе. Также могут быть добавлены солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как этоксилированные изостеариловые спирты и сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитола, консерванты, вкусовые добавки, такие как масло перечной мяты или другие натуральные подсластители, или сахарин или другие искусственные подсластители и тому подобное.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композициям для парентерального введения. Композиции, адаптированные для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, благодаря которым композиция становится изотоничной крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители. Композиции могут быть представлены в однодозных или многодозных контейнерах, например герметично закрытых ампулах и флаконах, и могут храниться в высушенном вымораживанием (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед использованием. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Активность. Биохимический анализ конкурентного связывания [³H]сGAMP со STING.

Отдельные соединения, описанные в приведенных в настоящем описании примерах, определены как агонисты STING по результатам (i) связывания с белком STING, что подтверждено с помощью снижения уровня связывания обогащенного тритием лиганда сGAMP с белком STING по меньшей мере на 20% при 20 мкМ (концентрация тестируемого соединения) в биохимическом анализе конкурентного связывания [³H]сGAMP со STING, и (ii) демонстрации выработки интерферона с индукцией секреции IFN-β 6% или более при 30 мкМ в анализе с использованием клеток THP1 (где индукция, вызванная сGAMP при 30 мкМ, составляла 100%).

Способность соединений связывать STING определяют количественно по способности конкурировать с обогащенным тритием лигандом сG-AMP за связывание с мембраной с человеческими рецепторами STING в анализе связывания на фильтрах с радиоактивностью. В анализе связывания используют рецептор STING, полученный из клеточных мембран Hi-Five, сверхэкспрессирующих полноразмерный HAQ STING, приготовленный в местной лаборатории, и обогащенный тритием лиганд сGAMP, также очищенный в местной лаборатории.

Следующие экспериментальные методики подробно описывают получение конкретных примеров настоящего изобретения. Соединения примеров представлены в их нейтральных формах в описанных ниже процедурах и таблицах. В некоторых случаях соединения выделяли в виде солей в зависимости от способа, используемого для их конечной очистки, и/или характерных молекулярных свойств. Примеры представлены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким бы то ни было образом.

Примеры

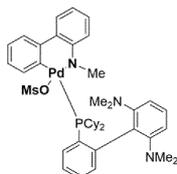
Сокращения.

(COCl) ₂	Оксалилхлорид
¹⁹ F NMR	¹⁹ F ядерная магнитно-резонансная спектроскопия
¹ H NMR	¹ H (Протонная) ядерная магнитно-резонансная спектроскопия
2', 3'-cGAMP, cGAMP	2', 3'-циклический аденозинмонофосфат
ACN, MeCN, CH ₃ CN	Ацетонитрил
AcOH, HOAc	Уксусная кислота
AlCl ₃	Трихлорид алюминия
AMP	Аденозинмонофосфат
aq	Водный
Ar	Аргон
ATP	Аденозин-5'-трифосфат
BIIC	Клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом
br	Широкий
Br ₂	Бром
кат.	Каталожный номер
CD ₃ OD	Обогащенный дейтерием метиловый спирт, обогащенный дейтерием метанол
CDCl ₃	Дейтерированный трихлорметан
cGAMP	Циклическая GMP-AMP синтаза
CH ₂ I ₂	Дийодметан
CH ₃ Cl	Хлорметан, метилхлорид
CHCl ₃	Трихлорметан
Ki	Кюри, внесистемная единица измерения радиоактивности; 1 Ки=3,7×10 ¹⁰ Бк, где Бк - Беккерель, единица радиоактивности в СИ, эквивалентная 1 распаду в секунду (dps)
CO ₂	Диоксид углерода
CPhos Pd G4	2-Аминобифенилпалладиевый метансульфонатпалладиевый прекатализатор CPhos (4-ое поколение прекатализаторов)
Cs ₂ CO ₃	Карбонат цезия
Cu-Cl	Хлорид меди (I)
Cu-I	Йодид меди (I)
Cy	Циклогексил
d	Дублет
DCE	1,2-дихлорэтан
DCM, CH ₂ Cl ₂	Дихлорметан
ддд	Дублет дублетов дублетов
ддт	Дублет дублетов триплетов
DMAP	4-диметиламинопиридин
DMEA	N,N-диметилаэтиламин
DMF	N,N-диметилформамид
DMSO, DMCO	Диметилсульфоксид
DMTr	4, 4'-диметокситритил

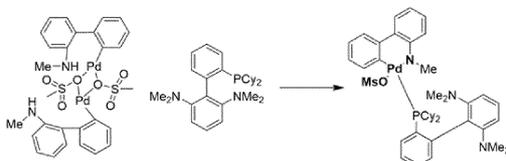
DMTrCl	4,4'-диметокситритилхлорид
дкв	Дублет квартетов
EC ₅₀	Полумаксимальная эффективная концентрация; концентрация лекарственного средства, антитела или токсического вещества, которая вызывает ответ посередине между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия
EDC	Этилендихлорид
экв.	Эквиваленты
ES	Электронное распыление
Et	Этил
Et ₂ O	Простой диэтиловый эфир
Et ₂ Z	Диэтилцинк
EtOAc	Этилацетат
EtOH	Этиловый спирт, этанол
г	Грамм
GMP	Гуанозин-5'-монофосфат
GTP	Гуанозин-5'-трифосфат
ч	Час
H ₂	Водород (газ)
H ₂ SO ₄	Серная кислота
HAQ STING	Распространенный вариант STING, содержащий три мутации R71H-G230A-R293Q (конструкция ДНК, используемая в данном документе: STING(1-379)R71H,G230A, H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8/pBAC1)
HCl	Соляная кислота
HEPES	2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоная кислота, цвиттерийонный органический химический буферный агент
гепт	Гептет
Hex	Гексаны
HNO ₃	Азотная кислота
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
Гц	Герц
IC ₅₀	Полумаксимальная ингибирующая концентрация; концентрация лекарственного средства, антитела или токсического вещества, необходимая для 50% ингибирования ответа или связывания
Inh	Ингибирование
J	Константа взаимодействия ЯМР
K ₂ CO ₃	Карбонат калия
KCl	Хлорид калия
KOH	Гидроксид калия
ЖХМС	Жидкостная хроматография - масс-спектрометрия
LDA	Диизопропиламид лития
LiOH	Гидроксид лития
LiOH · H ₂ O	Гидроксид лития моногидрат
м	Мультиплет
М	Молярное отношение, моль/л
m/z	Отношение массы к заряду
M+N	Протонированная масса, измерение массы, произведенное масс-спектрометрией
мКи	Милликюри
Me	Метил
MeB(OH) ₂	Метилбороновая кислота
MeMgBr	Метилмагнийбромид
MeOH, CH ₃ OH	Метанол
мг	Миллиграмм
MgCl ₂	Хлорид магния
MgSO ₄	Сульфат магния
МГц	Мегагерц
мин	Минута (минуты)
мл	Миллилитр
мМ	Миллимоль на литр
ммоль	Миллимоль
MOI	Множественность заражения
N ₂	Азот (газ)
Na ₂ CO ₃	Карбонат натрия

Na ₂ SO ₄	Сульфат натрия
NaCl	Хлорид натрия
NaHCO ₃	Бикарбонат натрия
NaHSO ₃	Бисульфит натрия
NaHSO ₄	Бисульфат натрия, гидросульфат натрия
NaOH	Гидроксид натрия
нг	Нанограмм (нанограммы)
NH ₃	Аммиак
NH ₄ Cl	Хлорид аммония
NH ₄ OH	Гидроксид аммония
мл	Нанолитр
нм	Нанометр
нМ	Наномоль
NMP	N-метил-2-пирролидон
Pd(Ph ₃ P) ₄	Тетракис (трифенилфосфин) палладий (0)
Pd/C	Палладий на угле
Pd ₂ (dba) ₃	Трис (дибензилиденацетон) дипалладий (0)
PE	Простой петролейный эфир
pfu, БОЕ	Еляшкообразующая единица
преп-ВЭЖХ	Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография
преп-ТСХ	Препаративная тонкослойная жидкостная хроматография
PST (фунт/кв. дюйм)	Фунты на квадратный дюйм
Pу, ру	Пиридин
кв	Квартет
RPM, об/мин	Число оборотов в минуту
КТ, кТ	Комнатная температура, приблизительно 25°C
с	Синглет
насыщ.	Насыщенный
СФХ	Сверхкритическая флюидная хроматография
SiO ₂	Кремний, диоксид кремния
SO ₂ Cl ₂	Сульфурилхлорид
SOCl ₂	Тионилхлорид
т	Триплет
t-BuLi	t-бутиллитий, трет-бутиллитий
TFA	Трифторуксусная кислота
THF	Тetraгидрофуран
ТСХ	Тонкослойная хроматография
TMSCl	Триметилсилилхлорид
T _r	Время удерживания
TrisCl	Трис (гидроксиэтил) аминометан гидрохлорид
об./об.	Объем/объем
WT STING	Вариант STING дикого типа (наиболее распространенный) у людей (конструкция ДНК, используемая здесь: STING(1-379)H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8/pBAC1)
X-Phos	2-Дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенил
λ _{вп}	Длина волны излучения
λ _{вз}	Длина волны возбуждения
мг, мкг	Микрограмм
мл, мкл	Микролитр
мМ, мкМ	Микромоль
мм, мкм	Микрометр

Получение 1. CPhos Pd G4.

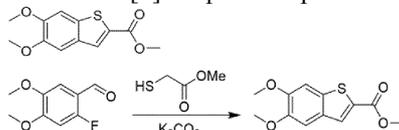


Стадия 1. CPhos Pd G4.



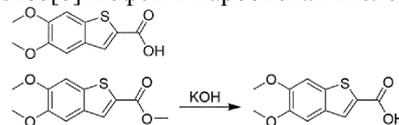
Смесь димера (2'-метиламино-1,1'-бифенил-2-ил)метансульфонатпалладия (II) (439 мг, 0,573 ммоль) и 2'-(дициклогексилфосфино)-N2,N2,N6,N6-тетраметил-[1,1'-бифенил]-2,6-диамина (500 мг, 1,15 ммоль) в DCM (6 мл) перемешивали при КТ в течение 2 ч. Затем раствор разбавляли Et₂O (30 мл). Раствор фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Затем остаток суспендировали в пентанах и снова концентрировали при пониженном давлении с получением CPhos Pd G4 (см. Bruno, N.C.; Niljianskul, N.; Buchwald, S.L.J. Org. Chem. 2014, 79, 4161).

Получение 2. Метил-5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилат



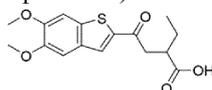
К перемешиваемому раствору 2-фтор-4,5-диметоксибензальдегида (18,7 г, 102 ммоль) в DMF (600 мл) добавляли метил-2-меркаптоацетат (11,9 г, 112 ммоль) и K₂CO₃ (42,1 г, 305 ммоль). Полученную смесь затем нагревали при 60°C в течение 15 ч. После охлаждения до КТ реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток разбавляли H₂O (500 мл) и экстрагировали DCM (600 мл). Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением метил-5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилата. ЖХМС (C₁₂H₁₃O₄S) (ES, m/z): 253 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,03 (с, 1H), 7,60 (с, 1H), 7,49 (с, 1H), 3,85 (с, 6H), 3,82 (с, 3H).

Получение 3. 5,6-Диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновая кислота

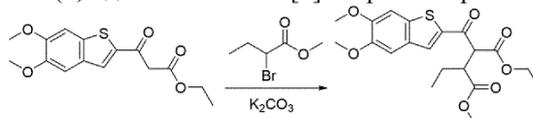


К суспензии метил-5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилата из получения 2 (23 г, 91 ммоль) в MeOH (200 мл), THF (200 мл) и H₂O (200 мл) добавляли KOH (51 г, 910 ммоль). Полученную суспензию нагревали до 60°C в течение 30 мин. После охлаждения до КТ реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. К полученному остатку добавляли H₂O (600 мл), и затем к раствору добавляли лимонную кислоту для доведения pH до 6. Осажденный материал собирали фильтрацией с получением 5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновой кислоты. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 7,94 (с, 1H), 7,58 (с, 1H), 7,48 (с, 1H), 3,85 (с, 3H), 3,82 (с, 3H).

Пример 1. 4-(5,6-Диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-этил-4-оксобутановая кислота

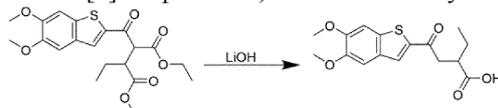


Стадия 1. 1-Этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонил)-3-этилсукцинат



К перемешиваемому раствору 3-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноата (коммерчески доступного от Specs, 0,10 г, 0,32 ммоль) в DMF (1,6 мл) добавляли метил 2-бромбутират (37 мкл, 0,32 ммоль) и K₂CO₃ (54 мг, 0,39 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при КТ и затем разбавляли H₂O (3 мл) и DCM (6 мл). Фазы разделяли и водный слой промывали дополнительным количеством DCM (3×6 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и сушили в течение ночи в глубоком вакууме. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением 1-этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонил)-3-этилсукцината, который использовали без дополнительной очистки. ЖХМС (C₂₀H₂₅O₇S) (ES, m/z): 409[M+H]⁺.

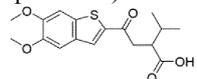
Стадия 2. 4-(5,6-Диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-этил-4-оксобутановая кислота



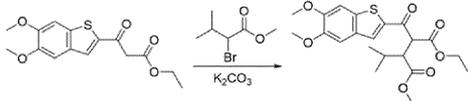
К смеси 1-этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонил)-3-этилсукцината (83 мг, 0,20 ммоль) в THF (1,8 мл) и H₂O (0,18 мл) добавляли LiOH (39 мг, 1,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при КТ, после чего смесь гасили водным 2 M HCl (0,30 мл, 0,59 ммоль) и затем разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-этил-4-оксобутановой кислоты. Рацемическую

смесь разделяли с помощью хиральной СФХ (Chiracel OJ-H (250×21 мм), 25% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением двух соединений со временем удерживания 3,65 и 5,26 мин. Концентрация первого пика элюирования давала продукт. ЖХМС (C₁₆H₁₉O₅S) (ES, m/z): 323[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,15 (с, 1H), 7,52 (с, 1H), 7,40 (с, 1H), 3,79 (с, 3H), 3,77 (с, 3H), 3,35-3,27 (м, 1H), 3,00-2,94 (м, 1H), 2,73-2,67 (м, 1H), 1,58-1,50 (м, 2H), 0,85 (т, J=7,3 Гц, 3H).

Пример 2. 4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-изопропил-4-оксобутановая кислота

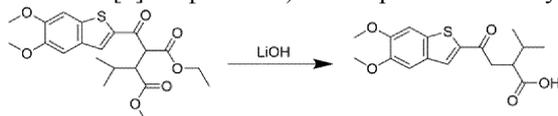


Стадия 1. 1-Этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)-3-изопропилсукцинат



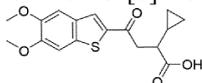
К перемешиваемой смеси этил 3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксoproпаноата (Spess, 0,15 г, 0,49 ммоль) в DMF (2,4 мл) добавляли метил-2-бромизовалерат (73 мкл, 0,49 ммоль) и K₂CO₃ (81 мг, 0,58 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при КТ и затем разбавляли H₂O (3,0 мл) и DCM (6,0 мл). Фазы разделяли и водный слой промывали дополнительным количеством DCM (3×6,0 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и сушили в течение ночи в глубоком вакууме. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в гексанах) с получением 1-этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)-3-изопропилсукцината, который использовали в последующей реакции без дополнительной очистки. ЖХМС (C₂₁H₂₇O₇S) (ES, m/z): 423[M+H]⁺.

Стадия 2. 4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-изопропил-4-оксобутановая кислота

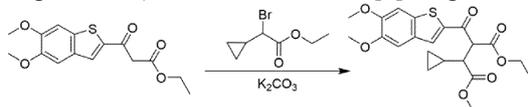


К смеси 1-этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)-3-изопропилсукцината (68 мг, 0,16 ммоль) в THF (0,80 мл), MeOH (0,40 мл) и H₂O (0,18 мл) добавляли LiOH (19 мг, 0,80 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при КТ, после чего смесь гасили водным 2 М HCl (0,40 мл, 0,80 ммоль) и затем разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением 4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-изопропил-4-оксобутановой кислоты. Рацемическую смесь разделяли с помощью хиральной СФХ (Chiralpak IC (250×21 мм), 40% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением двух соединений со временем удерживания 5,70 мин и 7,05 мин. Концентрация второго пика элюирования давала продукт. ЖХМС (C₁₇H₂₁O₅S) (ES, m/z): 337[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,17 (1H, с), 7,49 (с, 1H), 7,37 (с, 1H), 3,76 (с, 3H), 3,74 (с, 3H), 3,35-3,25 (м, 1H), 3,05-2,85 (м, 1H), 2,67-2,61 (м, 1H), 1,95-1,87 (м, 1H), 0,88-0,82 (м, 6H).

Пример 3. 2-Циклопропил-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

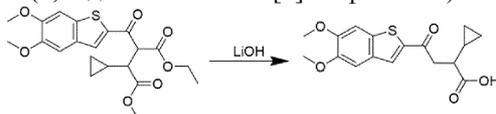


Стадия 1. Диэтил-2-циклопропил-3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)сукцинат



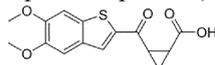
К перемешиваемой смеси этил-3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксoproпаноата (Spess, 0,30 г, 0,97 ммоль) в DMF (4,9 мл) добавляли этил-2-бром-2-циклопропилацетат (0,20 г, 0,97 ммоль) и затем K₂CO₃ (0,16 г, 1,2 ммоль) при КТ. Смесь оставляли перемешиваться в течение ночи и затем разбавляли H₂O (3,0 мл) и DCM (6,0 мл). Фазы разделяли и водный слой промывали DCM (3×6 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и сушили в течение ночи в глубоком вакууме. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением диэтил-2-циклопропил-3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)сукцината. ЖХМС (C₂₂H₂₇O₇S) (ES, m/z): 435[M+H]⁺.

Стадия 2. 2-Циклопропил-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

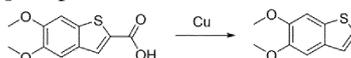


К смеси диэтил-2-циклопропил-3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)сукцината (90 мг, 0,21 ммоль) в THF (1,0 мл), MeOH (0,50 мл) и H₂O (0,50 мл) добавляли LiOH (25 мг, 1,0 ммоль) и смесь оставляли перемешиваться в течение 2 ч при КТ. Через 2 ч смесь подкисляли 1 н. HCl (0,50 мл, 1,0 ммоль) и затем разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в гексанах) с получением 2-циклопропил-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты в виде рацемической смеси. Рацемическую смесь разделяли с помощью хиральной СФХ (колонка OJ-H, 25% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением двух соединений со временем удерживания 5,3 и 6,9 мин. Концентрация первого пика элюирования давала продукт. ЖХМС (C₁₇H₁₉O₅S) (ES, m/z): 335[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,23 (с, 1H), 7,58 (с, 1H), 7,46 (с, 1H), 3,85 (с, 3H), 3,83 (с, 3H), 3,51-3,43 (м, 2H), 2,13-2,08 (м, 1H), 0,99-0,87 (м, 1H), 0,54-0,34 (м, 4H).

Пример 4. 2-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоновая кислота

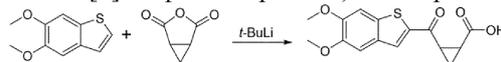


Стадия 1. 5,6-Диметоксибензо[b]тиофен



К перемешиваемому раствору 5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (получение 3, 2,0 г, 8,39 ммоль) в хинолине (20 мл) добавляли медь (0,907 г, 14,3 ммоль) и затем смесь нагревали при 190°C в течение 2 ч. После охлаждения до КТ смесь разбавляли EtOAc и затем последовательно промывали водн. HCl (2 М), H₂O, насыщ. водн. NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором. Органический слой сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением 5,6-диметоксибензо[b]тиофена. ЖХМС (C₁₀H₁₁O₂S) (ES, m/z): 195[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 7,54 (с, 1H), 7,51 (д, J=5,3 Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,29 (д, J=5,3 Гц, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,80 (с, 3H).

Стадия 2. 2-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоновая кислота

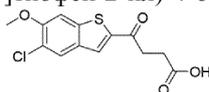


К перемешиваемому раствору 5,6-диметоксибензо[b]тиофена (500 мг, 2,57 ммоль) в THF (12 мл) добавляли t-BuLi (3,0 мл, 3,9 ммоль) (1,3 М в н-пентане) по каплям в течение 5 мин при -78°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при -78°C в течение 1 ч и затем по каплям в течение 10 мин добавляли 3-оксабицикло[3.1.0]гексан-2,4-дион (577 мг, 5,15 ммоль) в THF (10 мл). Смеси давали нагреться до КТ и затем перемешивали при КТ в течение 12 ч в атмосфере N₂. К смеси добавляли H₂O (15 мл) и затем смесь экстрагировали EtOAc (10 мл). Водный слой экстрагировали дополнительным количеством EtOAc (10 мл) и затем доводили до pH 5-6 с помощью водн. HCl (1 М) и дополнительно экстрагировали EtOAc (3 × 30 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (20 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 2-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоновой кислоты. Рацемическую смесь разделяли с помощью хиральной СФХ (колонка AD (250×30 мм), 40% (1:1 H₂O (+0,1% NH₃) и EtOH) в CO₂) с получением двух соединений со временем удерживания 5,61 и 6,22 мин. Концентрация первого пика элюирования давала продукт. ЖХМС (C₁₅H₁₅O₅S) (ES, m/z): 307[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 11,35 (с, 1H), 7,37 (с, 1H), 6,74 (с, 1H), 6,67 (с, 1H), 3,01 (с, 3H), 3,00 (с, 3H), 2,20 (м, 1H), 1,46-1,38 (м, 1H), 0,72-0,63 (м, 1H), 0,51-0,43 (м, 1H).

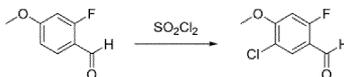
Примеры 5 и 6, показанные в табл. 1 ниже, были или могут быть получены согласно процедурам, аналогичным тем, которые описаны выше в примере 4, при использовании соответствующих исходных материалов, описанных в разделах "Получения" или полученных из коммерческих источников.

Таблица 1

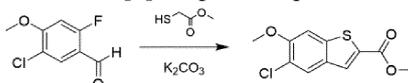
Прим .	Структура	Наименование	Масса [M+H] ⁺
5		2-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота (одиночный энантиомер)	355, 357
6		2-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота (одиночный энантиомер)	355, 357

Пример 7. 4-(5-Хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

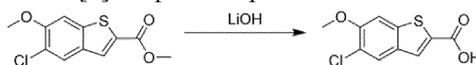
Стадия 1. 5-Хлор-2-фтор-4-метоксибензальдегид



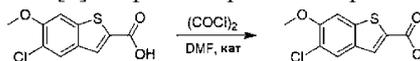
К перемешиваемому раствору 2-фтор-4-метоксибензальдегида (1,00 г, 6,49 ммоль) в AcOH (2 мл) добавляли SO_2Cl_2 (1,05 мл, 13,0 ммоль). После перемешивания при КТ в течение 12 ч реакция была завершена. Реакционную смесь выливали в ледяную воду (50 мл). Полученный осадок собирали вакуумной фильтрацией, промывали H_2O (3×20 мл) и сушили на воздухе с получением 5-хлор-2-фтор-4-метоксибензальдегида. ЖХМС ($\text{C}_8\text{H}_7\text{ClFO}_2$) (ES, m/z): 189[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 10,18 (с, 1H), 7,88 (д, $J=7,28$ Гц, 1H), 6,72 (д, $J=11,69$ Гц, 1H), 3,99 (с, 3H). ¹⁹F-НМР (376 МГц, CDCl_3): δ -119,91 (дд, $J=7,15, 11,32$ Гц).

Стадия 2. Метил-5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилат

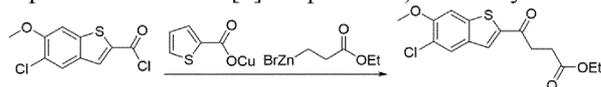
Смесь 5-хлор-2-фтор-4-метоксибензальдегида (1,04 г, 5,51 ммоль), метил-2-меркаптоацетата (0,740 мл, 8,27 ммоль), K_2CO_3 (2,29 г, 16,5 ммоль) и DMF (50 мл) перемешивали в течение 12 ч при 80°C. Реакционную смесь охлаждали до КТ и выливали в 500 мл ледяной воды. Добавляли водн. HCl (1 М) для доведения pH смеси до 5. Осадок собирали фильтрацией, промывали H_2O (3×100 мл) и сушили при пониженном давлении с получением метил-5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилата, который использовали непосредственно на следующей стадии. ЖХМС ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClO}_3\text{S}$) (ES, m/z): 257 [M+H]⁺.

Стадия 3. 5-Хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновая кислота

К перемешиваемой суспензии метил-5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилата (1,15 г, 4,46 ммоль) в H_2O (10 мл), THF (10 мл) и MeOH (10 мл) добавляли LiOH- H_2O (0,562 г, 13,4 ммоль). Полученную смесь нагревали до 50°C в течение 3 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до КТ и органические растворители удаляли перегонкой при пониженном давлении. Остаток разбавляли H_2O (20 мл) и промывали DCM (3×10 мл). Водный слой подкисляли водн. 1 М HCl до pH 5 и полученный осадок промывали H_2O (3×10 мл). Оставшееся твердое вещество сушили при пониженном давлении с получением 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновой кислоты. ЖХМС ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClO}_3\text{S}$) (ES, m/z): 243 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 13,43 (ушир., 1H), 8,10 (с, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 3,94 (с, 3H).

Стадия 4. 5-Хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорид

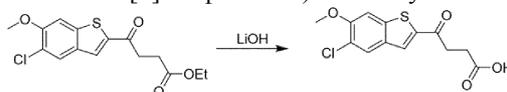
К смеси 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновой кислоты (215 мг, 0,886 ммоль) и THF (10 мл) добавляли $(\text{COCl})_2$ (0,4 мл, 4,73 ммоль) и DMF (4 мкл, 0,055 ммоль) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 16 ч и затем охлаждали до КТ. Смесь разбавляли толуолом (20 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Затем концентрированную реакционную смесь дважды повторно растворяли в толуоле (20 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Полученную концентрированную реакционную смесь сушили *in vacuo* при 50-80°C в течение 1 ч и затем заполняли газобразным Ag для хранения. Полученный 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорид использовали на следующей стадии непосредственно.

Стадия 5. Этил-4-(5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат

В высушенную в сушильном шкафу колбу Шленка загружали мешалку и ((тиофен-2-карбонил)окси)медь (500 мг, 2,62 ммоль) в атмосфере Ag. Колбу сушили при подключении к источнику глубокого вакуума с помощью нагревания феном в течение 3 мин. После охлаждения до 0°C бромид (3-этокси-3-оксопропил)цинка (II) (5,0 мл, 0,5 М в THF, 2,5 ммоль) добавляли в колбу с помощью шприца с образованием смеси. После перемешивания при 0°C в течение 40 мин к смеси добавляли раствор 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорида (272 мг, 0,885 ммоль) в THF (5 мл). Полученную смесь постепенно нагревали до КТ и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили насыщ. водн. раствором NH_4Cl (20 мл) и экстрагировали EtOAc (3×30 мл). Объединенные органические слои промывали насыщ. водн. раствором Na_2CO_3 (2×15 мл)) и насыщенным солевым раствором (10 мл), сушили над

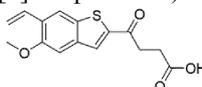
безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали преп-ВЭЖХ ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ с 0,1% TFA) с получением этил-4-(5-хлор-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClO}_4\text{S}$) (ES, m/z): 327[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,87 (с, 1H), 7,86 (с, 1H), 7,32 (с, 1H), 4,16 (кв, J=7,0 Гц, 2H), 3,99 (с, 3H), 3,32 (т, J=6,8 Гц, 2H), 2,78 (т, J=6,8 Гц, 2H), 1,27 (т, J=7,0 Гц, 5H).

Стадия 6. 4-(5-Хлор-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

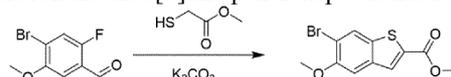


К перемешиваемому раствору этил-4-(5-хлор-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (62 мг, 0,19 ммоль) в MeOH (6 мл) и H_2O (3 мл) добавляли LiOH- H_2O (0,12 г, 5,0 ммоль). Смесь перемешивали при 45°C в течение 2 ч и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в H_2O (15 мл) и промывали DCM (2×15 мл). Водный слой подкисляли концентрированной водн. HCl до pH ~2 и затем экстрагировали DCM (5×10 мл). Объединенные органические фазы сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали преп-ВЭЖХ ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ с 0,1% TFA) с получением 4-(5-хлор-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClO}_4\text{S}$) (ES, m/z): 299[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, MeOH- d_4): δ 8,10 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,60 (с, 1H), 3,98 (с, 3H), 3,37-3,33 (м, 2H), 2,73 (т, J=6,5 Гц, 2H).

Пример 8. 4-(5-Метокси-6-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

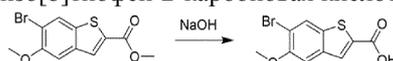


Стадия 1. Метил-6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилат



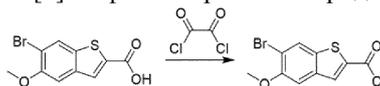
К перемешиваемому раствору 4-бром-2-фтор-5-метоксибензальдегида (5,00 г, 21,5 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли метил-2-меркаптоацетат (2,51 г, 23,6 ммоль) и K_2CO_3 (8,90 г, 64,4 ммоль). Реакционную смесь дегазировали N_2 3 раза. Полученную смесь затем перемешивали при КТ в течение 15 ч. EtOAc (500 мл) и H_2O (1200 мл) добавляли к реакционной смеси. Органический слой отделяли и промывали насыщенным соевым раствором (2×200 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в PE) с получением метил-6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата. ЖХМС ($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{BrO}_3\text{S}$) (ES, m/z): 301,303[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,01 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,26 (с, 1H), 3,96 (с, 3H), 3,94 (с, 3H).

Стадия 2. 6-Бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



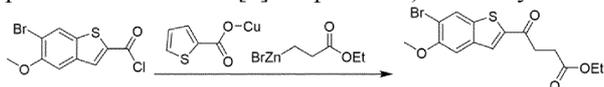
К суспензии метил-6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата (1,45 г, 4,81 ммоль) в MeOH (20 мл), THF (20 мл) и H_2O (20 мл) добавляли NaOH (1,93 г, 48,1 ммоль). Полученную суспензию нагревали до 50°C в течение 0,5 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. К остатку добавляли H_2O (200 мл) и добавляли лимонную кислоту для доведения pH раствора до 6. Оставшуюся водную суспензию экстрагировали EtOAc (3×50 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (100 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты, которую использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки. ¹H-ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,52 (ушир. с, 1H), 8,35 (с, 1H), 8,01 (с, 1H), 7,65 (с, 1H), 3,90 (с, 3H).

Стадия 3. 6-Бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорид



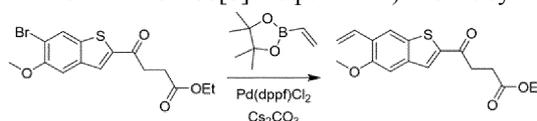
К перемешиваемому раствору 6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (800 мг, 2,79 ммоль) в безводном THF (6 мл) добавляли $(\text{COCl})_2$ (1/06 г, 8,36 ммоль) по каплям при 0°C. Затем смесь нагревали при 75°C в течение 15 ч и затем охлаждали до КТ. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного 6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида, который использовали непосредственно на следующей стадии без дальнейшей очистки.

Стадия 4. Этил-4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



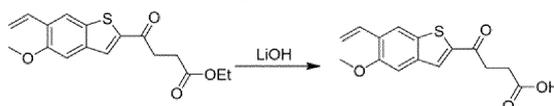
Раствор бромид (3-этокси-3-оксипропил)цинка (II) (19,6 мл, 0,5 М в THF, 9,82 ммоль) добавляли в высушенную в сушильном шкафу колбу, содержащую ((тиофен-2-карбонил)окси)медь (1,87 г, 9,82 ммоль) в атмосфере Ag при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин при 0°C в атмосфере Ag. Дегазированный Ag раствор 6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида (1,00 г, 3,27 ммоль) в THF (20 мл) затем добавляли в реакционную смесь при 0°C. Полученной суспензии давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 3 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C и гасили насыщ. водн. раствором NH₄Cl (50 мл). Смеси давали нагреться до КТ и перемешивали в течение 10 мин. Затем смесь фильтровали для удаления любого твердого осадка, и фильтрат разбавляли EtOAc (50 мл) и насыщенным солевым раствором (20 мл). Органический слой отделяли, промывали дополнительным насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (DCM в PE) с получением этил-4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₅H₁₆BrO₄S) (ES, m/z): 371, 373[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,05 (с, 1H), 7,92 (с, 1H), 7,30 (с, 1H), 4,18 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 3,98 (с, 3H), 3,34 (т, J=6,7 Гц, 2H), 2,80 (т, J=6,7 Гц, 2H), 1,28 (т, J=7,1 Гц, 3H).

Стадия 5. Этил-4-(5-метокси-6-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



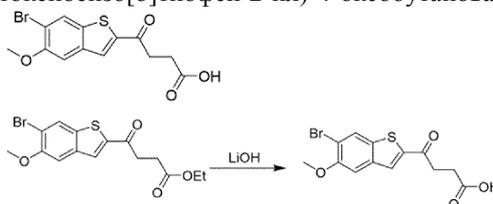
К перемешиваемой смеси этил-4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (40,0 мг, 0,108 ммоль), 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолана (33,2 мг, 0,215 ммоль) и CS₂CO₃ (105 мг, 0,323 ммоль) в 1,4-диоксане (1,0 мл) и H₂O (0,2 мл) добавляли дихлорид 1,1'-бис-(дифенилфосфино)ферроцена (12 мг, 0,022 ммоль). Реакционную смесь дегазировали, помещая ее под пониженное давление и заполняя N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 90°C в атмосфере N₂ в течение 2 ч, охлаждали до КТ и фильтровали для удаления любых твердых веществ. Фильтрат разбавляли EtOAc (5 мл) и насыщенным солевым раствором (5 мл). Органический слой отделяли, промывали дополнительным насыщенным солевым раствором (5 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением этил-4-(5-метокси-6-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата, который использовали для следующей стадии без дальнейшей очистки. ЖХМС (C₁₇H₁₉O₄S) (ES, m/z): 319 [M+H]⁺.

Стадия 6. 4-(5-Метокси-6-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота



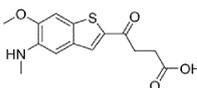
В перемешиваемую суспензию этил-4-(5-метокси-6-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (25 мг, 0,09 ммоль) в MeOH (0,5 мл), THF (0,5 мл) и H₂O (0,5 мл) добавляли LiOH (18,8 мг, 0,785 ммоль). Полученную суспензию нагревали до 50°C в течение 2 ч и затем охлаждали до КТ. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(5-метокси-6-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₅H₁₅O₄S) (ES, m/z): 291[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, MeOH-d₄): δ 8,10 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,09 (дд, J=11,3, 17,8 Гц, 1H), 5,87 (ушир. д, J=17,4 Гц, 1H), 5,32 (ушир. д, J=11,2 Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,37-3,32 (м, 2H), 2,71 (ушир. т, J=6,5 Гц, 2H).

Пример 9. 4-(6-Бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

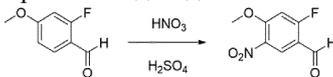


К суспензии этил-4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата из примера 8, стадия 4 (20 мг, 0,054 ммоль) в MeOH (0,5 мл), THF (0,5 мл) и H₂O (0,5 мл) добавляли LiOH (1,3 мг, 0,054 ммоль). Полученную суспензию нагревали до 50°C в течение 2 ч и затем охлаждали до КТ. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, и остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₃H₁₂BrO₄S) (ES, m/z): 343,345 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, MeOH-d₄): δ 8,12 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 7,53 (с, 1H), 3,95 (с, 3H), 3,36 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,74 (т, J=6,4 Гц, 2H).

Пример 10. 4-(6-Метокси-5-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

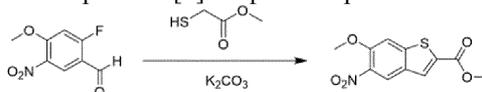


Стадия 1. 2-Фтор-4-метокси-5-нитробензальдегид



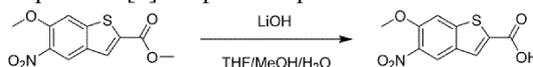
К перемешиваемому раствору 2-фтор-4-метоксибензальдегида (1,00 г, 6,49 ммоль) в концентрированной H_2SO_4 (5,88 мл, 110 ммоль) при -15°C добавляли концентрированную HNO_3 (0,414 мл, 6,49 ммоль) в концентрированной H_2SO_4 (0,795 мл, 14,9 ммоль) по каплям в течение 5 мин. После перемешивания в течение 1 ч при температуре ниже -10°C реакционную смесь выливали в 50 мл ледяной воды. Осадок собирали фильтрацией. Осадок на фильтре промывали H_2O (3×100 мл) и сушили при пониженном давлении с получением 2-фтор-4-метокси-5-нитробензальдегида, который использовали непосредственно на следующей стадии. ЖХМС ($\text{C}_8\text{H}_7\text{FNO}_4$) (ES, m/z): $200[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 10,22 (с, 1H), 8,47 (д, $J=7,24$ Гц, 1H), 6,88 (д, $J=11,54$ Гц, 1H), 4,07 (с, 3H).

Стадия 2. Метил-6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбоксилат



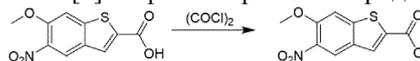
Смесь 2-фтор-4-метокси-5-нитробензальдегида (1,14 г, 5,72 ммоль), метил-2-меркаптоацетата (0,77 мл, 8,6 ммоль) и K_2CO_3 (2,37 г, 17,2 ммоль) в DMF (50 мл) перемешивали в течение 12 ч при 60°C . Реакционную смесь охлаждали до КТ и затем выливали в 500 мл ледяной воды. Добавляли водн. HCl (1 М) для доведения pH до 5. Осадок собирали фильтрацией, промывали H_2O (3×100 мл) и сушили при пониженном давлении с получением метил-6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбоксилата, который использовали непосредственно на следующей стадии. ЖХМС ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{S}$) (ES, m/z): $268[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 3. 6-Метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



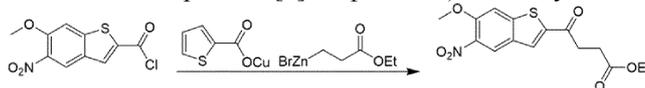
К суспензии метил-6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбоксилата (1,50 г, 5,61 ммоль) в H_2O (10 мл), THF (10 мл) и MeOH (10 мл) добавляли LiOH H_2O (0,707 г, 16,8 ммоль). Полученную смесь нагревали до 50°C в течение 5 ч и затем охлаждали до КТ. Органический растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток разбавляли 20 мл H_2O и смесь экстрагировали DCM (3×10 мл). Водный слой подкисляли водн. раствором HCl (1 М) до pH 5. Осадок собирали фильтрацией и затем промывали H_2O (3×10 мл). Полученную твердую фазу сушили при пониженном давлении с получением 6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты, которую использовали непосредственно на следующей стадии. ЖХМС ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_5\text{S}$) (ES, m/z): $254[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,93-13,26 (с, 1H), 8,58 (с, 1H), 8,12 (с, 1H), 8,05 (с, 1H), 3,98 (с, 3H).

Стадия 4. 6-Метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбонилхлорид



К перемешиваемому раствору 6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (400 мг, 1,58 ммоль) в безводном THF (15 мл) добавляли $(\text{COCl})_2$ (1,20 г, 9,48 ммоль) по каплям при 0°C . Смесь нагревали при 75°C в течение 15 ч и затем охлаждали до КТ. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного 6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида, который использовали без дальнейшей очистки на следующей стадии.

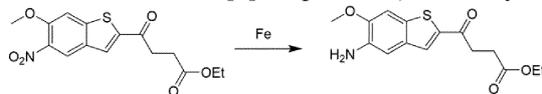
Стадия 5. Этил-4-(6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



Раствор бромида (3-этокси-3-оксопропил)цинка (II) (17,7 мл, 0,5 М в THF, 8,83 ммоль) добавляли в высушенную в сушильном шкафу колбу, содержащую ((тиофен-2-карбонил)окси)медь (1,69 г, 8,83 ммоль) в атмосфере Ar при 0°C . Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин при 0°C в атмосфере Ar . Дегазированный Ar раствор 6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида (800 мг, 2,94 ммоль) в THF (10 мл) затем добавляли в реакционную смесь при 0°C ; полученной суспензии давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 8 ч. Реакционную смесь затем охлаждали до 0°C и гасили насыщ. водн. раствором NH_4Cl (30 мл). Смеси давали нагреться до КТ и перемешивали в течение 10 мин. Смесь фильтровали и фильтрат разбавляли EtOAc (50 мл) и насыщенным солевым раствором (30 мл). Органический слой отделяли, промывали дополнительным насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Остаток очищали преп-ТСХ (SiO_2 , DCM в PE) с получением

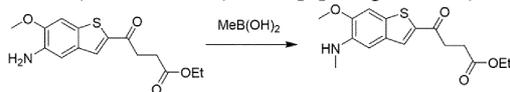
этил-4-(6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС ($C_{15}H_{16}NO_6S$) (ES, m/z): 338 $[M+H]^+$. 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,36 (с, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,47 (с, 1H), 4,24-4,16 (м, 2H), 4,05 (с, 3H), 3,34 (т, J=6,6 Гц, 2H), 2,81 (т, J=6,5 Гц, 2H), 1,33-1,27 (м, 3H).

Стадия 6. Этил-4-(5-амино-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



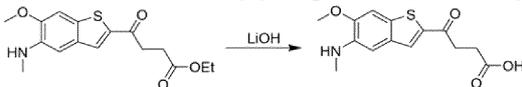
К раствору этил-4-(6-метокси-5-нитробензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (140 мг, 0,415 ммоль) в EtOH (2 мл), THF (2 мл), и H_2O (2 мл) добавляли Fe (116 мг, 2,08 ммоль) и NH_4Cl (222 мг, 4,15 ммоль). Смесь нагревали до $80^\circ C$ в течение 1 ч, охлаждали до КТ и фильтровали. К фильтрату добавляли H_2O (10 мл) и водный слой экстрагировали EtOAc (3×5 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (5 мл), сушили над $MgSO_4$ и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением этил-4-(5-амино-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата, который использовали непосредственно на следующей стадии без очистки. ЖХМС ($C_{15}H_{18}NO_4S$) (ES, m/z): 308 $[M+H]^+$.

Стадия 7. Этил-4-(6-метокси-5-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



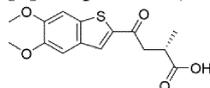
К перемешиваемому раствору этил-4-(5-амино-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (55 мг, 0,18 ммоль), $MeB(OH)_2$ (16,1 мг, 0,268 ммоль), и ru (56,6 мг, 0,716 ммоль) в 1,4-диоксане (2,0 мл) добавляли диацетоксимедь (48,8 мг, 0,268 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при $120^\circ C$ в течение 2 ч и затем охлаждали до КТ. Смесь фильтровали и фильтрат разбавляли EtOAc (5,0 мл) и насыщенным соевым раствором (5,0 мл). Органический слой отделяли, промывали дополнительным насыщенным соевым раствором (5 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением этил-4-(6-метокси-5-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата, который использовали непосредственно на следующей стадии без очистки. ЖХМС ($C_{16}H_{20}NO_4S$) (ES, m/z): 322 $[M+H]^+$.

Стадия 8. 4-(6-Метокси-5-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

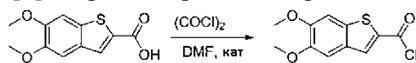


К суспензии этил-4-(6-метокси-5-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (30 мг, 0,093 ммоль) в MeOH (0,5 мл), THF (0,5 мл) и H_2O (0,5 мл) добавляли LiOH (44,7 мг, 1,87 ммоль). Полученную суспензию нагревали до $50^\circ C$ в течение 2 ч и затем охлаждали до КТ. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, и остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/ H_2O с 0,1% TFA) с получением 4-(6-метокси-5-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($C_{14}H_{16}NO_4S$) (ES, m/z): 294 $[M+H]^+$. 1H -ЯМР (400 МГц, MeOH- d_4): δ 8,07 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,27 (с, 1H), 3,99 (с, 3H), 3,36-3,33 (м, 2H), 2,94 (с, 3H), 2,73 (т, J=6,4 Гц, 2H).

Пример 11. (S)-4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

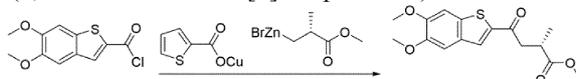


Стадия 1. 5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорид



К перемешиваемому раствору 5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты из получения 3 (5,0 г, 21 ммоль) в THF (200 мл) при $0^\circ C$ в атмосфере Ag добавляли $(COCl)_2$ (5,5 мл, 63 ммоль), затем DMF (0,1 мл, 1,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при $0^\circ C$ в течение 1 ч и затем давали нагреться до КТ и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученный 5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорид использовали на следующей стадии без очистки. 1H -ЯМР (600 МГц, CH_3CN-d_3): δ 8,25 (с, 1H), 7,46 (с, 1H), 7,45 (с, 1H), 3,92 (с, 3H), 3,88 (с, 3H).

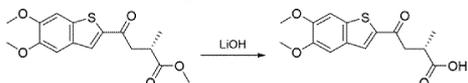
Стадия 2. Метил-(S)-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



В высушенную в сушильном шкафу, продуемую Ag круглодонную колбу, содержащую тиофен-2-карбоксилат меди (I) (797 мг, 4,2 ммоль), при $0^\circ C$ по каплям добавляли бромид (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксипропил) цинка (II) (7,8 мл, 0,5 M в THF, 3,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при $0^\circ C$ в течение 20 мин. Суспензию 5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида (777 мг, 3,0 ммоль) в THF

(15 мл) добавляли по каплям в реакционную смесь. Реакционной смеси давали нагреться до КТ и перемешивали в течение 6 ч. Реакционную смесь разбавляли насыщ. водн. раствором NH_4Cl (15 мл), а затем DCM (30 мл). Осадки удаляли фильтрацией перед экстракцией. Слои разделяли и водный слой экстрагировали DCM (3×30 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле ((25% EtOH в EtOAc) в Hex) с получением метил-(S)-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС ($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 323[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, $\text{CHCl}_3\text{-d}$): δ 7,89 (с, 1H), 7,26 (с, 2H), 4,00 (с, 3H), 3,97 (с, 3H), 3,72 (с, 3H), 3,48 (дд, J=16,9, 7,6 Гц, 1H), 3,22-3,16 (м, 1H), 3,05 (дд, J=16,9, 6,0 Гц, 1H), 1,31 (д, J=7,2 Гц, 3H).

Стадия 3. (S)-4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



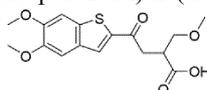
К раствору метил-(S)-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (200 мг, 0,62 ммоль) в H_2O (1,2 мл) и THF (5 мл) добавляли LiOH (59 мг, 2,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при КТ. Реакционную смесь доводили до ~pH 2, используя дополнительную 1 М водн. HCl. К реакционной смеси добавляли DCM (15 мл) и слои разделяли. Органический слой концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле ((25% EtOH в EtOAc) в Hex) с получением (S)-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 309[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$): δ 8,06 (с, 1H), 7,41 (с, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,88 (с, 3H), 3,46 (дд, J=17,1, 8,3 Гц, 1H), 3,08 (дд, J=17,2, 5,3 Гц, 1H), 3,04-2,98 (м, 1H), 1,26 (д, J=7,1 Гц, 3H).

Примеры 12-16, показанные в табл.2 ниже, были или могут быть получены согласно процедурам, аналогичным тем, которые описаны выше в примере 11, при использовании соответствующих исходных материалов, описанных в разделах "Получения" или полученных из коммерческих источников.

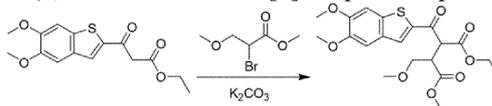
Таблица 2

Прим .	Структура	Наименование	Масса [M+H] ⁺
12		трет-бутил-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат	295 [M - C ₄ H ₉]
13		(S)-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	327
14		4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота	313
15		(S)-4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	357, 359
16		4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота	295

Пример 17. 4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-(метоксиметил)-4-оксобутановая кислота

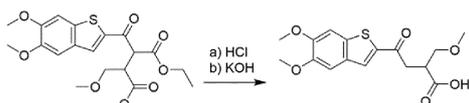


Стадия 1. 1-Этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)-3-(метоксиметил)сукцинат



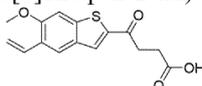
К перемешиваемому раствору этил-3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксипропаноата (Specs, 231 мг, 0,75 ммоль) в DMF (2,5 мл) добавляли метил-2-бром-3-метоксипропаноат (125 мкл, 0,93 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при КТ. Затем реакционную смесь разбавляли H_2O (3 мл) и DCM (6 мл). Фазы разделяли и водный слой промывали DCM (3×6 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и сушили в течение ночи in vacuo. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле ((25% EtOH в EtOAc) в Hex) с получением 1-этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)-3-(метоксиметил)сукцината, который использовали без дальнейшей очистки. ЖХМС ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{S}$) (ES, m/z): 425[M+H]⁺.

Стадия 2. 4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-(метоксиметил)-4-оксобутановая кислота

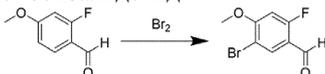


К перемешиваемому раствору 1-этил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)-3-(метоксиметил)сукцината (200 мг, 0,5 ммоль) в EtOH (3 мл) добавляли водн. раствор HCl (490 мкл, 6 М, 2,9 ммоль) при КТ. Реакционную смесь нагревали до 100°C в герметично закрытом флаконе для микроволновой печи в течение 2 ч. После охлаждения к перемешиваемой реакционной смеси добавляли водн. раствор KOH (490 мкл, 10 М, 4,9 ммоль) и реакционную смесь продолжали нагревать при 100°C в течение 1 ч. pH реакционной смеси доводили до ~2 с помощью водн. раствора HCl (1 М) в соответствии с тест-полосками pH. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления EtOH, затем разбавляли DCM (10 мл). Слои разделяли и водный слой экстрагировали DCM (3×10 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле ((25% EtOH в EtOAc) в Hex). Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-(метоксиметил)-4-оксобутановой кислоты. Рацемическую смесь разделяли с помощью хиральной СФХ (Chiracel OJ-H (250×21 мм), 25% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением двух соединений со временем удерживания 3,12 и 3,96 мин. Концентрация первого пика элюирования давала продукт. ЖХМС (C₁₆H₁₉O₆S) (ES, m/z): 339[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 12,32 (1H, ушир. с), 8,18 (1H, с), 7,56 (1H, с), 7,44 (1H, с), 3,83 (3H, с), 3,80 (3H, с), 3,58-3,51 (2H, м), 3,46-3,40 (1H, м), 3,22 (3H, с), 3,09-3,07 (2H, м).

Пример 18. 4-(6-Метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

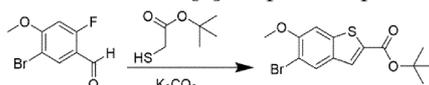


Стадия 1. 5-Бром-2-фтор-4-метоксибензальдегид



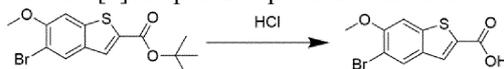
2-Фтор-4-метоксибензальдегид (9,0 г, 58 ммоль) добавляли медленно (порционно) к раствору Br₂ (6,0 мл, 120 ммоль) в MeOH (40 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Раствор NaHSO₃ (24,3 г, 234 ммоль) в H₂O (300 мл) медленно добавляли к реакционной смеси при 0°C. Полученную суспензию затем перемешивали в течение 30 мин при 0°C. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат промывали дополнительным количеством воды (3×25 мл). Фильтрат затем сушили при пониженном давлении с получением 5-бром-2-фтор-4-метоксибензальдегида. Продукт использовали без очистки. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 10,02 (с, 1H), 7,98 (д, J=7,5 Гц, 1H), 7,26 (д, J=13,0 Гц, 1H), 3,97 (с, 3H).

Стадия 2. Трет-бутил-5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилат

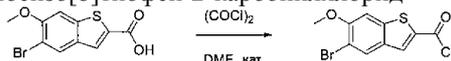


K₂CO₃ (19,0 г, 137 ммоль) добавляли медленно (порционно) к раствору 5-бром-2-фтор-4-метоксибензальдегида (10,7 г, 45,8 ммоль) и трет-бутил-2-меркаптоацетата (6,65 мл, 45,8 ммоль) в DMF (50 мл) при 20°C в атмосфере Ar. Реакционную смесь перемешивали и нагревали до 100°C в течение 16 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до КТ и разбавляли Et₂O (1000 мл). Затем смесь промывали H₂O (500 мл, затем 2×250 мл) и объединенные водные слои экстрагировали Et₂O (2×200 мл). Органические слои затем объединяли и промывали насыщенным солевым раствором (50 мл). Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением трет-бутил-5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата. Продукт использовали без очистки. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,26 (с, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 3,92 (с, 3H), 1,55 (с, 9H).

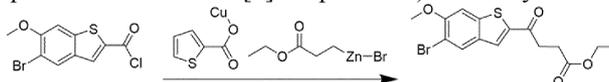
Стадия 3. 5-Бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



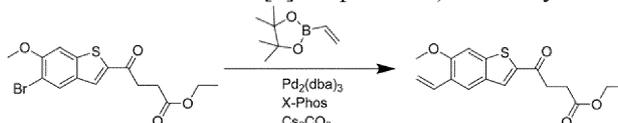
HCl (56 мл, 4,0 М в 1,4-диоксане, 230 ммоль) добавляли к раствору трет-бутил-5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата (15,5 г, 45,0 ммоль) в DCM (200 мл) при 20°C. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 3 дней. Затем реакционную смесь разбавляли добавлением по каплям Hex (500 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение дополнительных 2 ч после добавления при КТ. Реакционную смесь фильтровали и собранные твердые вещества промывали Hex (2×50 мл) и сушили при пониженном давлении с получением 5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты, которую использовали без очистки. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 13,42 (с, 1H), 8,26 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 3,93 (с, 3H).

Стадия 4. 5-Бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорид

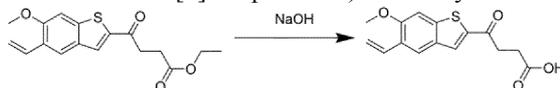
DMF (0,049 мл, 0,63 ммоль) добавляли медленно (по каплям) к раствору 5-бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновой кислоты (6,0 г, 21 ммоль) и $(\text{COCl})_2$ (5,5 мл, 63 ммоль) в THF (100 мл) при 0°C в атмосфере Ar. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч и затем давали нагреться до КТ. Реакционную смесь перемешивали в течение 18 ч при КТ. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением 5-бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорида. Продукт использовали без очистки.

Стадия 5. Этил-4-(5-бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат

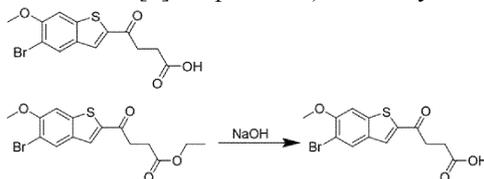
Раствор бромида (3-этокси-3-оксипропил)цинка(II) (13,8 мл, 0,50 М в THF, 6,9 ммоль) добавляли в высушенную в сушильном шкафу колбу, содержащую ((тиофен-2-карбонил)окси)медь (1,31 г, 6,87 ммоль) в атмосфере Ar при 0°C . Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин при 0°C в атмосфере Ar. Дегазированный Ar раствор 5-бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорида (1,52 г, 4,98 ммоль) в THF (25,0 мл) затем добавляли через канюлю в реакционную смесь при 0°C ; полученной суспензии давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и гасили насыщ. водн. NH_4Cl (50 мл). Смеси давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 10 мин. Смесь фильтровали и фильтрат разбавляли EtOAc (500 мл) и насыщенным соевым раствором (50 мл). Органический слой отделяли, промывали дополнительным насыщенным соевым раствором (25 мл), сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в DCM) с получением этил-4-(5-бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrO}_4\text{S}$) (ES, m/z): 371, 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 8,27 (с, 1H), 8,26 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 4,07-4,02 (м, 2H), 3,94 (с, 3H), 3,35-3,25 (м, 2H), 2,68-2,64 (м, 2H), 1,20-1,14 (м, 3H).

Стадия 6. Этил-4-(6-метокси-5-винилбензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат

К дегазированной Ar смеси этил-4-(5-бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (100 мг, 0,269 ммоль), 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолана (50 мг, 0,32 ммоль), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (12 мг, 0,013 ммоль), X-phos (13 мг, 0,027 ммоль) и Cs_2CO_3 (263 мг, 0,808 ммоль) добавляли 1,4-диоксан (3 мл) и H_2O (0,3 мл) при дегазации Ar. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при дегазации Ar (подповерхностное барботирование), после чего смесь нагревали до 90°C в атмосфере Ar в течение 2 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до КТ и разбавляли EtOAc (20 мл). Полученную суспензию фильтровали через фритту, содержащую MgSO_4 . Органический слой (фильтрат) концентрировали при пониженном давлении. Полученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в DCM) с получением этил-4-(6-метокси-5-винилбензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{S}$) (ES, m/z): 319 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

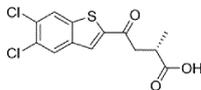
Стадия 7. 4-(6-Метокси-5-винилбензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

Водный раствор NaOH (0,33 мл, 1,0 М, 0,33 ммоль) добавляли к раствору этил-4-(6-метокси-5-винилбензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (21 мг, 0,066 ммоль) в MeOH (4,0 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 18 ч. Реакционную смесь гасили водным раствором HCl (0,33 мл, 1 М, 0,33 ммоль) и затем концентрировали при пониженном давлении. Полученный неочищенный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/ H_2O с 0,1% TFA) с получением 4-(6-метокси-5-винилбензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{S}$) (ES, m/z): 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 12,21 (с, 1H), 8,27 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 7,65 (с, 1H), 7,00 (дд, $J=17,5$, 11,5 Гц, 1H), 5,87 (д, $J=17,5$ Гц, 1H), 5,33 (д, $J=11,5$ Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,30-3,24 (м, 2H), 2,63-2,56 (м, 2H).

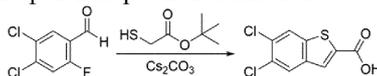
Пример 19. 4-(5-Бром-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

Водный раствор NaOH (0,54 мл, 1 М, 0,54 ммоль) добавляли к раствору этил-4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата из примера 17, стадия 5 (40 мг, 0,11 ммоль) в MeOH (2,0 мл). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 24 ч. Реакционную смесь гасили водным раствором HCl (0,54 мл, 1 М, 0,54 ммоль). Затем смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₃H₁₂BrO₄S) (ES, m/z): 343, 345[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,23 (с, 1H), 8,27 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 3,94 (с, 3H), 3,29-3,24 (м, 2H), 2,62-2,57 (м, 2H).

Пример 20. 4-((S)-4-(5,6-Дихлорбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

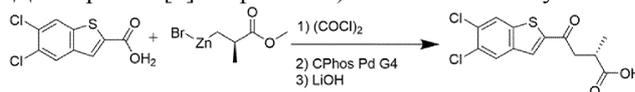


Стадия 1. 5,6-Дихлорбензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



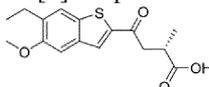
К раствору 4,5-дихлор-2-фторбензальдегида (V-Pharma, 386 мг, 2,00 ммоль), трет-бутил-2-меркаптоацетата (356 мг, 2,40 ммоль) и толуола (5 мл) добавляли Cs₂CO₃ (1,30 г, 4,00 ммоль) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и фильтрат промывали толуолом (5 мл). Затем к фильтрату добавляли TFA (10 мл) и смесь перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, промывали толуолом и гексанами и сушили при пониженном давлении с получением 5,6-дихлорбензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты. ЖХМС (C₉H₃Cl₂O₂S) (ES, m/z): 245[M-H]⁻.

Стадия 2. (S)-4-(5,6-Дихлорбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

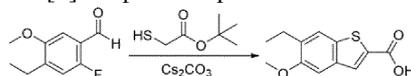


К смеси 5,6-дихлорбензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (0,049 г, 0,20 ммоль) и DCM (2 мл) добавляли DMF (4 мкл, 0,055 ммоль). Затем добавляли (COCl)₂ (0,175 мл, 2,00 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в THF (2,0 мл), добавляли CPhos Pd G4 из получения 1 (0,033 г, 0,040 ммоль) и смесь перемешивали при добавлении сразу всего бромида (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксопропил)цинка(II) (0,40 мл, 0,5 М в THF, 0,20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч и затем добавляли LiOH (0,048 г, 2,0 ммоль), H₂O (1 мл) и MeOH (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение еще 2 ч и затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(5,6-дихлорбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₃H₁₁Cl₂O₃S) (ES, m/z): 317 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 8,45 (с, 1 H), 8,31 (с, 1H), 8,28 (с, 1H), 3,38 (дд, J=17,4, 8,5 Гц, 1H), 3,10 (дд, J=17,6, 5,0 Гц, 1H), 2,90-2,84 (м, 1H), 1,16 (д, 3H).

Пример 21. (S)-4-(6-Этил-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

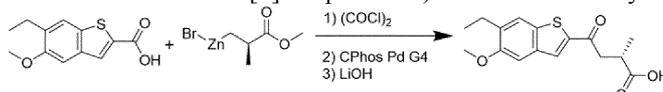


Стадия 1. 6-Этил-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



К перемешиваемому раствору 4-этил-2-фтор-5-метоксибензальдегида (Biogene Organics, 364 мг, 2,00 ммоль), трет-бутил-2-меркаптоацетата (356 мг, 2,40 ммоль) и толуола (5 мл) добавляли Cs₂CO₃ (1,30 г, 4,00 ммоль) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и фильтрат промывали толуолом (5 мл). Затем к фильтрату добавляли TFA (10 мл) и смесь перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, промывали толуолом и Hex и сушили при пониженном давлении с получением 6-этил-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты. ЖХМС (C₁₂H₁₁O₃S) (ES, m/z): 236[M-H]⁻.

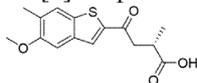
Стадия 2. (S)-4-(6-Этил-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



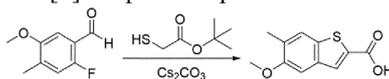
К смеси 6-этил-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (0,047 г, 0,20 ммоль) и DCM (2 мл) добавляли DMF (4 мкл, 0,055 ммоль). Затем добавляли (COCl)₂ (0,175 мл, 2,00 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в THF (2,0 мл), добавляли CPhos Pd G4 из получения 1 (0,033 г, 0,040 ммоль) и

смесь перемешивали при добавлении сразу всего бромида (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксопропил)цинка(II) (0,40 мл, 0,5 М в THF, 0,20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч и затем добавляли LiOH (48 мг, 2,0 ммоль), H₂O (1 мл) и MeOH (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение еще 2 ч и затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Затем остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(6-этил-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₆H₁₉O₄S) (ES, m/z): 307[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 8,21 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,43 (с, 1H), 3,83 (с, 3H), 3,38 (дд, J=17,4, 8,5 Гц, 1H), 3,07 (дд, J=17,4, 5,1 Гц, 1H), 2,87-2,84 (м, 1H), 2,65 (кв, J=7,5 Гц, 2H), 1,16-1,14 (м, 6H).

Пример 22. (S)-4-(5-метокси-6-метилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

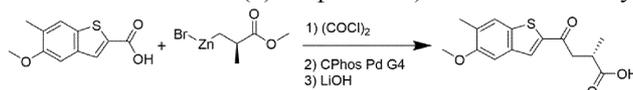


Стадия 1. 5-Метокси-6-метилбензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



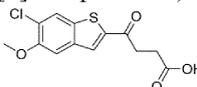
К перемешиваемому раствору 2-фтор-5-метокси-4-метилбензальдегида (Biogene Organics, 336 мг, 2,00 ммоль), трет-бутил-2-меркаптоацетата (356 мг, 2,40 ммоль) и толуола (5 мл) добавляли Cs₂CO₃ (1,30 г, 4,00 ммоль) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат промывали толуолом (5 мл). Затем к фильтрату добавляли TFA (10 мл) и смесь перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, промывали толуолом и Hex и сушили при пониженном давлении с получением 5-метокси-6-метилбензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты. ЖХМС (C₁₁H₉O₃S) (ES, m/z): 221 [M-H]⁻.

Стадия 2. (S)-4-(5-метокси-6-метилбензо(b)тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

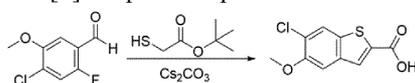


К смеси 5-метокси-6-метилбензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (0,044 г, 0,20 ммоль) и DCM (2 мл) добавляли DMF (4 мкл, 0,055 ммоль). Затем добавляли (COCl)₂ (0,175 мл, 2,00 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в THF (2,0 мл), добавляли CPhos Pd G4 (0,033 г, 0,040 ммоль) и смесь перемешивали при добавлении сразу всего бромида (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксопропил)цинка(II) (0,40 мл, 0,5 М в THF, 0,20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч и затем добавляли LiOH (48 мг, 2,0 ммоль), H₂O (1 мл) и MeOH (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение еще 2 ч и затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Затем остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(5-метокси-6-метилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₅H₁₇O₄S) (ES, m/z): 293 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 8,21 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,42 (с, 1H), 3,83 (с, 3H), 3,38 (дд, J=17,4, 8,5 Гц, 1H), 3,06 (дд, J=17,4, 5,2 Гц, 1H), 2,88-2,83 (м, 1H), 2,24 (с, 3H), 1,15 (д, J=7,2 Гц, 3H).

Пример 23. 4-(6-Хлор-5-метоксибензо [b] тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

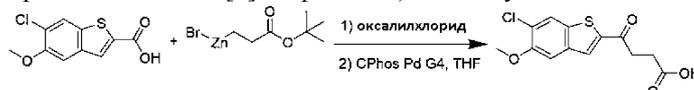


Стадия 1. 6-Хлор-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



К перемешиваемому раствору 4-хлор-2-фтор-5-метоксибензальдегида (38 мг, 0,20 ммоль), трет-бутил-2-меркаптоацетата (54 мг, 0,30 ммоль) и 1,4-диоксана (2 мл) добавляли Cs₂CO₃ (326 мг, 1,00 ммоль) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч. Затем реакционную смесь фильтровали, промывали 1,4-диоксаном (2 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Концентрат суспендировали в DCM (1 мл) и добавляли TFA (1 мл). Затем реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением 6-хлор-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты. ЖХМС (C₁₀H₆ClO₃S) (ES, m/z): 241[M-H]⁻.

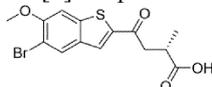
Стадия 2. 4-(6-Хлор-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота



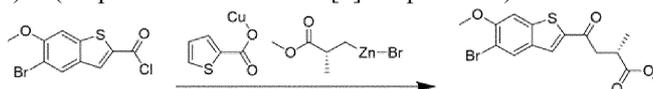
К смеси 6-хлор-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (0,045 г, 0,20 ммоль) и DCM (2 мл) добавляли DMF (4 мкл, 0,055 ммоль). Затем добавляли (COCl)₂ (0,175 мл, 2,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в THF (2,0 мл), добавляли CPhos Pd G4 из получения 1 (0,033 г, 0,040 ммоль) и смесь пе-

ремешивали при добавлении сразу всего бромида 3-трет-бутокси-3-оксопропилцинка (0,40 мл, 0,5 М в THF, 0,20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч и затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Затем добавляли DCM (1 мл) и TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение еще 2 ч и затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Затем остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(6-хлор-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₃H₁₂ClO₄S) (ES, m/z): 299[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 8,23 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 7,65 (с, 1H), 3,89 (с, 3H), 3,23 (т, J=6,6 Гц, 2H), 2,52 (т, J=6,4 Гц, 2H).

Пример 24. (S)-4-(5-Бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

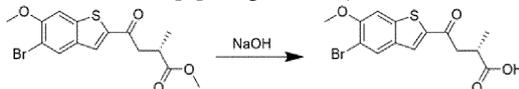


Стадия 1. Метил-(S)-4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



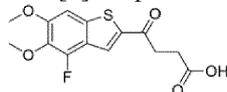
Раствор бромида (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксопропил)цинка(II) (57,7 мл, 0,5 М) в ТГФ (28,9 ммоль) добавляли в высушенную в сушильном шкафу колбу, содержащую ((тиофен-2-карбонил)окси)медь (5,50 г, 28,9 ммоль) в атмосфере Ar при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин при 0°C в атмосфере Ar. Дегазированный Ar раствор 5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида из примера 18, стадия 4 (6,39 г, 20,9 ммоль) в THF (100 мл) затем добавляли через канюлю в реакционную смесь при 0°C. Полученной суспензии давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли через канюлю к перемешиваемой смеси насыщ. водн. NH₄Cl (300 мл) и EtOAc (500 мл). Смеси давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 16 ч. Смесь фильтровали и фильтрат разбавляли EtOAc (1000 мл) и насыщенным соевым раствором (100 мл). Органический слой отделяли, промывали дополнительным насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в DCM) с получением метил (S)-4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₅H₁₆BrO₄S) (ES, m/z): 371, 373 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,27-8,24 (м, 2H), 7,80 (с, 1H), 3,94 (с, 3H), 3,59 (с, 3H), 3,46-3,39 (м, 1H), 3,23-3,16 (м, 1H), 3,01-2,93 (м, 1H), 1,19 (д, J=7,0 Гц, 3H).

Стадия 2. (S)-4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

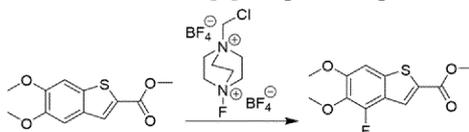


Водный раствор NaOH (0,61 мл, 1 М, 0,61 ммоль) добавляли к раствору метил-(S)-4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (50 мг, 0,14 ммоль) в THF (4,0 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 18 ч. Реакционную смесь гасили водным раствором HCl (0,61 мл, 1 М, 0,61 ммоль). Затем смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта, который очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(5-бром-6-метоксибензо [b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₄H₁₄BrO₄S) (ES, m/z): 357, 359 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,22 (с, 1H), 8,27-8,24 (м, 2H), 7,81 (с, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,44-3,35 (м, 1H), 3,14-3,06 (м, 1H), 2,94-2,85 (м, 1H), 1,18 (д, J=7,5 Гц, 3H).

Пример 25. 4-(4-Фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

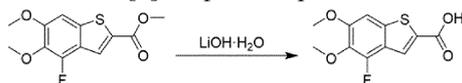


Стадия 1. Метил-4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилат



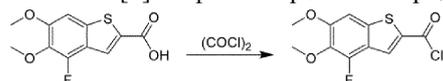
1-Хлорметил-4-фтор-1,4-дизониабицикло[2.2.2]октана бис-(тетрафторборат) (SelectfluorTM, 77 мг, 0,22 ммоль) добавляли к смеси метил-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата из получения 2 (50 мг, 0,20 ммоль) в ACN (1 мл) при КТ. Полученную смесь перемешивали при 45°C в течение 15 ч. Смесь охлаждали до КТ, разбавляли насыщ. водн. NaHCO₃ (10 мл) и экстрагировали EtOAc 3×10 мл. Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали преп-ТСХ (SiO₂, EtOAc в PE) с получением метил-4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата. ЖХМС (C₁₂H₁₂FO₄S) (ES, m/z): 293 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,05 (с, 1H), 7,08 (с, 1H), 3,99 (с, 3H), 3,97 (с, 3H), 3,94 (с, 3H).

Стадия 2. 4-Фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоновая кислота



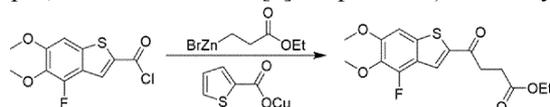
LiOH·H₂O (71,4 мг, 1,70 ммоль) добавляли порциями к смеси метил-4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата (46 мг, 0,170 ммоль) в THF (3 мл), MeOH (1 мл) и H₂O (1 мл) при КТ. Затем смесь перемешивали в течение 15 ч. Смесь доводили до pH 5 с помощью 1 н. HCl и экстрагировали EtOAc (3×10 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты. ЖХМС (C₁₁H₉FO₄S) (ES, m/z): 257 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,12 (с, 1H), 7,09 (с, 1H), 3,99 (с, 3H), 3,97 (с, 3H).

Стадия 3. 4-Фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорид



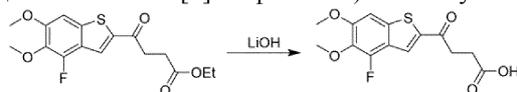
К перемешиваемому раствору 4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (153 мг, 0,60 ммоль) в безводном THF (5 мл) добавляли (COCl)₂ (0,21 мл, 2,40 ммоль) по каплям при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем при КТ в течение 1 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением 4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида, который использовали без дальнейшей очистки.

Стадия 4. Этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



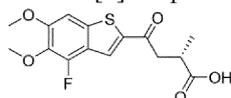
Суспензию тиофен-2-карбоксилата меди (I) (125 мг, 0,65 ммоль) барботировали N₂ в течение 5 мин и затем охлаждали до 0°C. Раствор бромида (3-этокси-3-оксипропил)цинка(II) (17,7 мл, 0,5 М в THF, 8,83 ммоль) добавляли в атмосфере N₂ при 0°C, и реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин при 0°C. Барботированный N₂ раствор 4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида (130 мг, 0,47 ммоль) в THF (3 мл) затем добавляли в реакционную смесь при 0°C. Полученной суспензии давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 8 ч. Реакционную смесь выливали в насыщ. водн. NH₄Cl (20 мл) при перемешивании. Смесь экстрагировали EtOAc (2×20 мл). Объединенные органические слои промывали H₂O и насыщенным соевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₆H₁₈FO₅S) (ES, m/z): 341 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 8,02 (д, J=0,7 Гц, 1H), 7,10 (т, J=1,0 Гц, 1H), 4,19 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 4,05-3,97 (м, 6H), 3,36 (т, J=6,7 Гц, 2H), 2,81 (т, J=6,7 Гц, 2H), 1,29 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Стадия 5. 4-(4-Фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

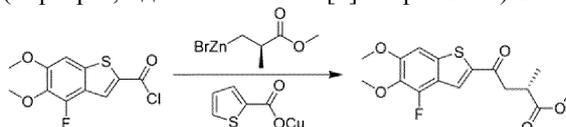


К раствору этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (124 мг, 0,36 ммоль) в MeOH (1,5 мл) и THF (1,5 мл) добавляли 1 н. водн. LiOH (1,5 мл, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч и затем добавляли 1 н. HCl (1,5 мл, 1,5 ммоль). Полученный осадок собирали фильтрованием с отсасыванием и очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₄H₁₄FO₅S) (ES, m/z): 313 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,19 (с, 1H), 8,33 (д, J=0,7 Гц, 1H), 7,59 (д, J=1,2 Гц, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,87 (с, 3H), 3,35-3,28 (м, 2H), 2,64-2,57 (м, 2H).

Пример 26. (S)-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



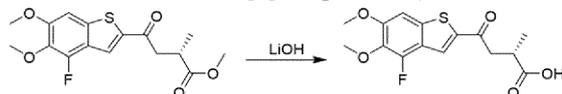
Стадия 1. Метил-(S)-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



Суспензию тиофен-2-карбоксилата меди (I) (125 мг, 0,65 ммоль) барботировали N₂ в течение 5 мин

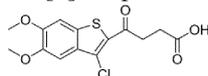
и затем охлаждали до 0°C. Раствор бромида (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксопропил)цинка(II) (1,21 мл, 0,5 М в THF, 0,606 ммоль) добавляли в атмосфере N₂ и реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин при 0°C. Затем добавляли барботированный N₂ раствор 4-фтор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-карбонилхлорида из примера 25, стадия 3 (130 мг, 0,47 ммоль) в THF (3 мл), и полученной суспензии давали нагреться до КТ и перемешивали в течение дополнительных 8 ч. Реакционную смесь выливали в насыщ. водн. NH₄Cl (20 мл) при перемешивании и затем экстрагировали EtOAc (2×20 мл). Объединенные органические слои промывали H₂O и насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением метил-(S)-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₆H₁₈FO₅S) (ES, m/z): 341 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 7,98 (д, J=0,7 Гц, 1H), 7,09 (т, J=1,0 Гц, 1H), 4,04-3,95 (м, 6H), 3,72 (с, 3H), 3,50 (дд, J=17,0, 7,9 Гц, 1H), 3,23-3,12 (м, 1H), 3,06 (дд, J=17,0, 5,7 Гц, 1H), 1,32 (д, J=7,2 Гц, 3H).

Стадия 2. (S)-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

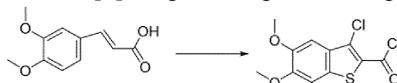


К раствору метил-(S)-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (90 мг, 0,26 ммоль) в MeOH (1,5 мл) и THF (1,5 мл) добавляли 1 н. водн. LiOH (1,5 мл, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч и затем добавляли 1 н. HCl (1,5 мл, 1,5 ммоль). Полученный осадок собирали фильтрованием с отсасыванием и очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₅H₁₆FO₅S) (ES, m/z): 327 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 5 12,21 (с, 1H), 8,33 (д, J=0,7 Гц, 1H), 7,59 (д, J=1,1 Гц, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,87 (с, 3H), 3,48 (дд, J=17,6, 8,7 Гц, 1H), 3,14 (дд, J=17,6, 5,0 Гц, 1H), 2,95-2,84 (м, 1H), 1,19 (д, J=7,3 Гц, 3H).

Пример 27. 4-(3-Хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

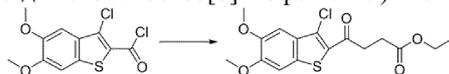


Стадия 1. 3-Хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-карбонилхлорид



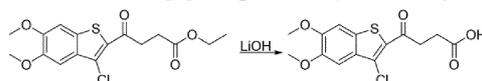
К реакционной смеси (E)-3-(3,4-диметоксифенил)акриловой кислоты (5,7 г, 27 ммоль) в хлорбензоле (40 мл) медленно добавляли SOCl₂ (9,0 мл, 120 ммоль). Через 30 мин при КТ медленно добавляли ру (0,58 мл, 7,1 ммоль). Затем смесь нагревали с обратным холодильником в течение 24 ч. После охлаждения до комнатной температуры смесь концентрировали при пониженном давлении с получением 3-хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-карбонилхлорида, который переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки.

Стадия 2. Этил-4-(3-хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



В высушенную в сушильном шкафу круглодонную колбу добавляли Cu-Cl (510 мг, 5,2 ммоль). Реакционную колбу продували Ag. Бромид (3-этокси-3-оксопропил)цинка(II) (0,5 М в THF, 12 мл, 6,2 ммоль) добавляли при КТ. Через 30 мин при КТ добавляли смесь 3-хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-карбонилхлорида (1,5 г, 5,2 ммоль) в THF (10 мл). Через 30 мин смесь гасили насыщ. NH₄Cl (6,0 мл) и разбавляли EtOAc. Органический слой отделяли и затем концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex), получая этил-4-(3-хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат. ЖХМС (C₁₆H₁₈ClO₅S) (ES, m/z): 357 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ацетон-d₆): δ 7,56 (с, 1H), 7,36 (с, 1H), 4,13 (кв, J=7,1 Гц, 2H), 3,98 (с, 3H), 3,97 (с, 3H), 3,47 (т, J=6,3 Гц, 2H), 2,75 (т, J=6,3 Гц, 2H), 1,24 (т, J=7,1 Гц, 3H).

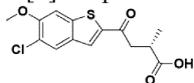
Стадия 3. 4-(3-Хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота



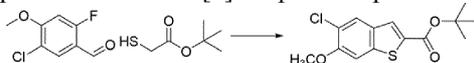
Смесь этил-4-(3-хлор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (58 мг, 0,16 ммоль) и LiOH (23 мг, 0,98 ммоль) в THF (1,5 мл), H₂O (0,40 мл) и MeOH (1,0 мл) оставляли перемешиваться при КТ в течение 1,5 ч. Величину pH реакционной смеси доводили до 3-4 с помощью HCl (1 н. в H₂O) и затем разбавляли DCM. Органический слой отделяли, и затем H₂O слой повторно экстрагировали DCM (2×20 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O в 0,1% TFA). Жидкие фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и затем сушили вымораживанием с помощью лиофи-

лизатора с получением 4-(3-хлор-5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($C_{14}H_{14}ClO_5S$) (ES, *m/z*): 329 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 12,22 (с, 1H), 7,67 (с, 1H), 7,29 (с, 1H), 3,90 (с, 3H), 3,88 (с, 3H), 3,34 (т, J=5,0 Гц, 2H), 2,62 (т, J=6,2 Гц, 2H).

Пример 28. (S)-4-(5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

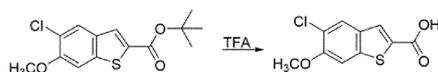


Стадия 1. трет-Бутил-5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилат



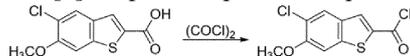
К смеси 5-хлор-2-фтор-4-метоксибензальдегида (0,055 г, 0,3 ммоль), Cs₂CO₃ (0,49 г, 1,5 ммоль) и диоксана (1,5 мл) добавляли трет-бутил-2-меркаптоацетат (0,053 г, 0,36 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 6 ч. Через 6 ч смеси давали возможность остыть до КТ и затем разбавляли диоксаном (2,0 мл). Добавляли макропористый связанный с полистиролом изоцианат (1,59 ммоль/г - 0,50 г) и реакционную смесь встряхивали при КТ в течение 1 ч. Через 1 ч смесь фильтровали, промывали диоксаном и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенной смеси, содержащей трет-бутил-5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилат, который переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки или характеристики.

Стадия 2. 5-Хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновая кислота



В неочищенный остаток, содержащий трет-бутил-5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоксилат, добавляли DCM (1,0 мл) и TFA (1,0 мл). Через 1 ч смесь разбавляли Hex (2,0 мл) и затем концентрировали при пониженном давлении с получением 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновой кислоты, которую переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки или характеристики.

Стадия 3. 5-Хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорид



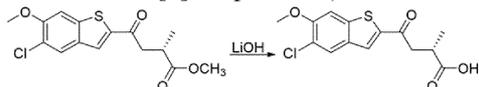
В неочищенный остаток, содержащий 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновую кислоту, добавляли смесь DMF в DCM (0,05M DMF в DCM, 1,5 мл). (COCl)₂ (0,13 мл, 1,5 ммоль) добавляли медленно в реакционную смесь и смесь перемешивали в течение 1 ч. Через 1 ч смесь разбавляли Hex и затем концентрировали при пониженном давлении с получением 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорида, который переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки или характеристики.

Стадия 4. Метил-(S)-4-(5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



В неочищенный остаток, содержащий 5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонилхлорид и бромид (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксопропил)цинк(II) (0,5M в THF, 1,2 мл, 0,60 ммоль), добавляли дифенилфосфин-Pd(II), катализатор, связанный с органомремнеземной матрицей (([O₃Si]_n(CH₂)_yDPP-Pd), коммерчески доступной как SiliaCat® DPP-Pd R390-100, от Silicycle, 0,25 ммоль/г, 0,23 г, 0,060 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 18 ч. Затем смесь разбавляли THF (4 мл) и добавляли N,N-диэтаноламинотетрагидрофуран (1,6 ммоль/г, 0,50 г). Смесь оставляли перемешиваться в течение 1 ч. Через 1 ч смесь фильтровали, твердые вещества промывали THF (3,5 мл) и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением метил-(S)-4-(5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата, который переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки или характеристики.

Стадия 5. (S)-4-(5-Хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



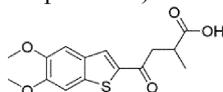
В неочищенную реакционную смесь, содержащую метил-(S)-4-(5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат, добавляли THF (1,0 мл), MeOH (0,30 мл) и водн. LiOH (1 M в H₂O, 1,0 мл, 1,0 ммоль). Через 3 ч при комнатной температуре смесь гасили AcOH (0,20 мл) и смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в ДМСО (1,5 мл) и смесь очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (ACN/H₂O, 0,1% TFA) с получением (S)-4-(5-хлор-6-метоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($C_{14}H_{13}ClO_4S$) (ES, *m/z*): 313[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8,26 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 7,84 (с, 1H), 3,95 (с, 3H), 3,41 (дд, J=17,2, 8,4 Гц, 1H), 3,09 (дд, J=17,4, 5,0 Гц, 1H), 2,94-2,85 (м, 1H), 1,19 (д, J=7,2 Гц, 3H).

Примеры 29-34, показанные в табл.3 ниже, были или могут быть получены согласно процедурам, аналогичным тем, которые описаны выше в примере 28, при использовании соответствующих исходных материалов, описанных в разделах "Получения" или полученных из коммерческих источников.

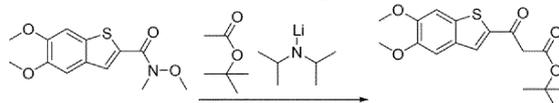
Таблица 3

Прим	Структура	Наименование	Масса [M+H] ⁺
29		(S)-4-(6-бром-5-метилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	341, 343
30		(S)-4-(5-фтор-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	297
31		(S)-4-(5,6-диметилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	337
32		(S)-4-(6-бром-5-хлорбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	361, 363
33		(S)-4-(5-хлор-6-этоксibenzo[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	327
34		(S)-4-(5-бром-6-метилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	341, 343

Пример 35. 4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

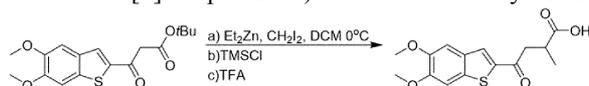


Стадия 1. трет-Бутил 3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноат



В колбу, содержащую THF (10 мл) при -78°C , добавляли LDA (2 М в смеси THF/гептан/бензол, 4,2 мл, 8,4 ммоль). По каплям добавляли трет-бутилацетат (1,1 мл, 8,3 ммоль). После завершения добавления смесь оставляли перемешиваться при -78°C в течение 15 мин. Добавляли по каплям смесь N,5,6-триметокси-N-метилбензо[b]тиофен-2-карбоксамид (1,9 г, 6,9 ммоль) в THF (15 мл). После завершения добавления смесь оставляли перемешиваться при -78°C в течение 1 ч. Затем смеси давали нагреться до КТ. После нагревания до КТ смесь охлаждали до 5°C и затем гасили водн. HCl (1 н.) до pH 2. Смесь экстрагировали изопропилацетатом (2×20 мл). Объединенные органические слои промывали насыщ. водн. NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением трет-бутил-3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноата. ЖХМС (C₁₇H₂₁O₅S -C₄H₈) (ES, m/z): 281 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 8,12 (с, 1H), 7,57 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 4,00 (с, 2H), 3,82 (с, 3H), 3,79 (с, 3H), 1,36 (с, 9H).

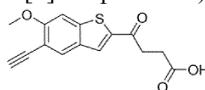
Стадия 2. 4-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



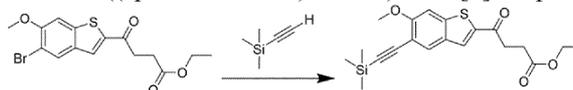
Et₂Zn (1 М в Hex, 6,0 мл, 6,0 ммоль) добавляли к DCM (20 мл) при 0°C в атмосфере N₂. Затем по каплям добавляли CH₂I₂ (0,50 мл, 6,0 ммоль). После перемешивания смеси при 0°C в течение 10 мин добавляли трет-бутил-3-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноат (0,50 г, 1,5 ммоль) с последующим добавлением TMSCl (20 мкл, 0,15 ммоль). Смеси давали нагреться до КТ и затем перемешивали в течение 18 ч. Затем реакцию гасили насыщ. водн. NH₄Cl и экстрагировали DCM (3×20 мл). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в DCM (30 мл) и добавляли TFA (0,50 мл, 6,0 ммоль). После перемешивания реакционной смеси в те-

ние 20 мин реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Продукт очищали обращенно-фазовой преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₅H₁₆O₅S) (ES, m/z): 309 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (CD₃OD, 600 МГц): δ 8,06 (с, 1H), 7,43-7,40 (м, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,88 (с, 3H), 3,46 (дд, J=17,8 Гц, 1H), 3,08 (дд, J=17,5 Гц, 1H), 3,02 (секстет, J=7,0 Гц, 1H), 1,26 (д, J=7 Гц, 3H).

Пример 36. 4-(5-Этинил-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

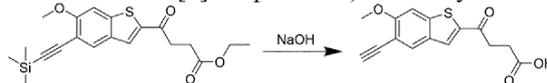


Стадия 1. Этил-4-(6-метокси-5-((триметилсилил)этинил)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



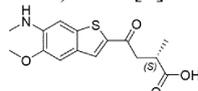
К дегазированной Ag смеси этил-4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (100 мг, 0,269 ммоль), Pd(PPh₃)₄ (78 мг, 0,067 ммоль) и Cu-I (51 мг, 0,27 ммоль) добавляли DMF (1,0 мл), затем триэтиламин (0,188 мл, 1,35 ммоль) и этинилтриметилсилан (0,192 л, 1,35 ммоль) при КТ при дегазации Ag. Смесь перемешивали в течение 5 мин при дегазации Ag (подповерхностное барботирование), после этого смесь перемешивали в атмосфере Ag при 20°C в течение 18 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (50 мл) и фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением этил-4-(6-метокси-5-((триметилсилил)этинил)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₂₀H₂₅O₄SSi) (ES, m/z): 389 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,25 (с, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,72 (с, 1H), 4,06 (кв, J=7,0 Гц, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,34-3,30 (м, 2H), 2,68-2,64 (м, 2H), 1,17 (т, J=7,0 Гц, 3H), 0,24 (с, 9H).

Стадия 2. 4-(5-Этинил-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

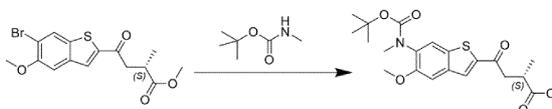


NaOH (1 М в H₂O, 1,0 мл, 1,0 ммоль) добавляли к суспензии этил-4-(6-метокси-5-((триметилсилил)этинил)бензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (61 мг, 0,16 ммоль) в MeOH (5,0 мл). Полученную суспензию перемешивали при 20°C в течение 2,5 ч. Реакционную смесь гасили HCl (37% в H₂O, 0,083 мл, 1,0 ммоль). Затем смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением 4-(5-этинил-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₅H₁₃O₄S) (ES, m/z): 289 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,22 (с, 1H), 8,27 (с, 1H), 8,08 (с, 1H), 7,73 (с, 1H), 4,33 (с, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,30-3,24 (м, 2H), 2,63-2,57 (м, 2H).

Пример 37. (S)-4-(5-метокси-6-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

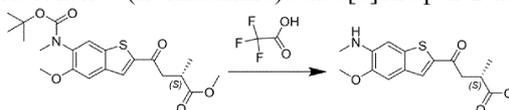


Стадия 1. (S)-метил-4-(6-((трет-бутоксикарбонил) (метил)амино)-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



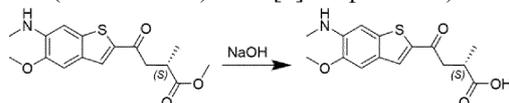
К дегазированной Ag смеси (S)-метил-4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (40 мг, 0,11 ммоль), трет-бутилметилкарбамата (21 мг, 0,16 ммоль), Pd₂(dba)₃ (5 мг, 5 мкмоль), 4,5-бис-(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантена (XantPhos, 9 мг, 0,02 ммоль) и Cs₂CO₃ (70 мг, 0,22 ммоль) добавляли диоксан (0,50 мл) при КТ при дегазации Ag. Смесь перемешивали в течение 5 мин при дегазации Ag (подповерхностное барботирование), после чего смесь нагревали до 95°C в атмосфере Ag в течение 12 ч. Реакционную смесь охлаждали до КТ и разбавляли EtOAc (20 мл). Полученную суспензию фильтровали через фритту, содержащую целит. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением (S)-метил-4-(6-((трет-бутоксикарбонил) (метил)амино)-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₂₁H₂₈NO₆S) (ES, m/z): 422 [M+H]⁺.

Стадия 2. (S)-метил-4-(5-метокси-6-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



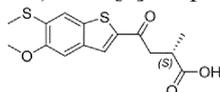
TFA (0,34 мл, 4,4 ммоль) добавляли к смеси (S)-метил-4-(6-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат (37 мг, 0,088 ммоль) в DCM (2,0 мл) при 20°C. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением (S)-метил-4-(5-метокси-6-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата в виде остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток использовали без последующей обработки или очистки на следующей стадии. ЖХМС ($C_{16}H_{20}NO_4S$) (ES, m/z): 322 [M+H]⁺.

Стадия 3. (S)-4-(5-метокси-6-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

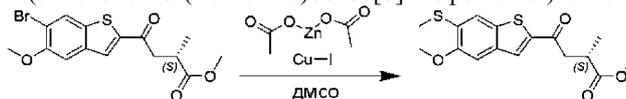


NaOH (2,0 М в H₂O, 0,35 мл, 0,70 ммоль) добавляли к смеси (S)-метил-4-(5-метокси-6-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (28 мг, 0,087 ммоль) в ДМСО (0,50 мл) и MeOH (2,0 мл) при 20°C. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 18 ч. Реакционную смесь гасили HCl (0,057 мл, 37% в H₂O, 0,70 ммоль) и затем разбавляли дополнительным количеством ДМСО (1,0 мл). Полученный неочищенный остаток очищали обращенно-фазовой преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(5-метокси-6-(метиламино)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($C_{15}H_{18}NO_4S$) (ES, m/z): 308[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,07 (с, 1H), 7,27 (с, 1H), 6,89 (с, 1H), 3,86 (с, 3H), 3,34-3,29 (м, 1H), 3,04-2,96 (м, 1H), 2,90-2,82 (м, 1H), 2,79 (с, 3H), 1,16 (д, J=7,0 Гц, 3H).

Пример 38. (S)-4-(5-метокси-6-(метилтио)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

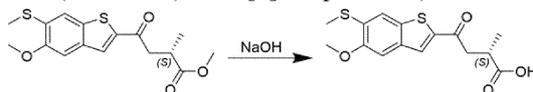


Стадия 1. (S)-метил-4-(5-метокси-6-(метилтио)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



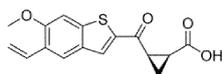
ДМСО (1,00 мл) добавляли к смеси (S)-метил-4-(6-бром-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (95 мг, 0,26 ммоль), Cu-I (12 мг, 0,064 ммоль) и ацетата цинка (94 мг, 0,51 ммоль). Полученную смесь нагревали до 120°C в течение 20 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь охлаждали до КТ и разбавляли EtOAc (50 мл) и затем фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-метил-4-(5-метокси-6-(метилтио)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС ($C_{16}H_{19}O_4S_2$) (ES, m/z): 339 [M+H]⁺.

Стадия 2. (S)-4-(5-метокси-6-(метилтио)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

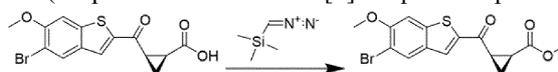


NaOH (2 М в H₂O, 0,19 мл, 0,38 ммоль) добавляли к раствору (S)-метил-4-(5-метокси-6-(метилтио)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (32 мг, 0,095 ммоль) в ДМСО (1,00 мл) при 20°C. Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 15 мин в атмосфере N₂. Затем реакционную смесь гасили HCl (0,035 мл, 37% в H₂O, 0,43 ммоль). Реакционную смесь фильтровали и очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(5-метокси-6-(метилтио)бензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($C_{15}H_{17}O_4S_2$) (ES, m/z): 325 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,23 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,47 (с, 1H), 3,89 (с, 3H), 3,45-3,37 (м, 1H), 3,13-3,07 (м, 1H), 2,91-2,88 (м, 1H), 2,47 (с, 3H), 1,18 (д, J=7,0 Гц, 3H).

Пример 39. (1S,2R)-2-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота



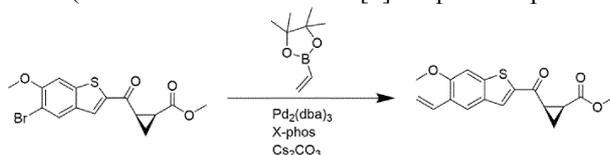
Стадия 1. (1S,2R)-метил-2-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоксилат



TMS-дiazометан (2 М в Hex, 1,4 мл, 2,8 ммоль) добавляли к смеси (1S,2R)-2-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоновой кислоты (891 мг, 2,51 ммоль) в DCM (20 мл) и MeOH (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. По-

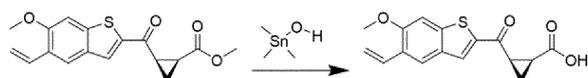
лученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением (1S,2R)-метил 2-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоксилата. ЖХМС (C₁₅H₁₄BrO₄S) (ES, m/z): 369, 371[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,30 (с, 1H), 8,28 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 3,94 (с, 3H), 3,47 (с, 3H), 3,18-3,12 (м, 1H), 2,44-2,39 (м, 1H), 1,60-1,57 (м, 1H), 1,42-1,39 (м, 1H).

Стадия 2. (1S,2R)-метил-2-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоксилат



К дегазированной Ag смеси (1S,2R)-метил-2-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоксилата (100 мг, 0,271 ммоль), 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолана (50 мг, 0,33 ммоль), Pd₂(dba)₃ (12 мг, 0,014 ммоль), X-Phos (12 мг, 0,027 ммоль) и Cs₂CO₃ (176 мг, 0,542 ммоль) добавляли диоксан (1,50 мл) и H₂O (0,2 мл) при КТ при дегазации Ag. Смесь перемешивали в течение 5 мин при дегазации Ag (подповерхностное барботирование), после чего смесь нагревали до 90°C в атмосфере Ag в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до КТ и разбавляли EtOAc (20 мл). Полученную суспензию фильтровали через фритту, содержащую MgSO₄. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением (1S,2R)-метил-2-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоксилата. ЖХМС (C₁₇H₁₇O₄S) (ES, m/z): 317 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,31 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,66 (с, 1H), 7,05-6,97 (м, 1H), 5,88 (д, J=17,5 Гц, 1H), 5,34 (д, J=11,5 Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,47 (с, 3H), 3,20-3,13 (м, 1H), 2,46-2,38 (м, 1H), 1,62-1,56 (м, 1H), 1,44-1,36 (м, 1H).

Стадия 3. (1S,2R)-2-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота



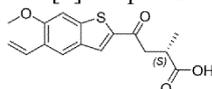
Гидроксид триметиллолова (34 мг, 0,19 ммоль) добавляли к смеси (1S,2R)-метил-2-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропанкарбоксилата (30 мг, 0,095 ммоль) в 1,2-дихлорэтане (2,0 мл) при 20°C. Реакционную смесь перемешивали и нагревали до 85°C в течение 2 дней. Реакционную смесь охлаждали до КТ и гасили NaHSO₄ (2 М в H₂O, 0,19 мл, 0,378 ммоль) и затем разбавляли EtOAc (100 мл) и H₂O (25 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщенным солевым раствором (10 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (1S,2R)-2-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновой кислоты. ЖХМС (C₁₆H₁₅O₄S) (ES, m/z): 303[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 12,22 (с, 1H), 8,28 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,65 (с, 1H), 7,05-6,96 (м, 1H), 5,88 (д, J=17,5 Гц, 1H), 5,33 (д, J=11,5 Гц, 1H), 3,90 (с, 3H), 3,10-3,02 (м, 1H), 2,30-2,25 (м, 1H), 1,56-1,50 (м, 1H), 1,34-1,30 (м, 1H).

Пример 40, показанный в табл.4 ниже, получали согласно процедурам, аналогичным тем, которые описаны выше в примере 39, с использованием соответствующих исходных материалов, описанных в разделах "Получения" или полученных из коммерческих источников.

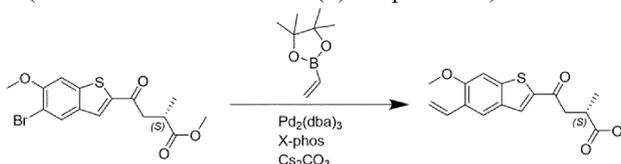
Таблица 4

Прим.	Структура	Наименование	Масса [M+H] ⁺
40		2-(6-метокси-5-(метилтио)бензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота	323

Пример 41. (S)-4-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



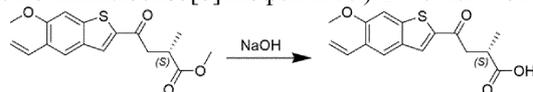
Стадия 1. (S)-метил-4-(6-метокси-5-винилбензо(b)тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



К дегазированной Ag смеси (S)-метил-4-(5-бром-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-

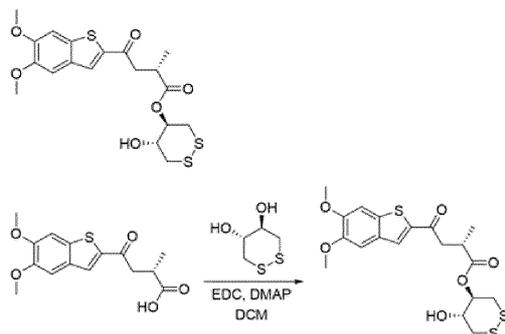
оксобутаноата (122 мг, 0,329 ммоль), 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолана (61 мг, 0,39 ммоль), Pd₂(dba)₃ (15 мг, 0,016 ммоль), X-Phos (15 мг, 0,033 ммоль) и CS₂CO₃ (321 мг, 0,986 ммоль) добавляли диоксан (3,0 мл) и H₂O (0,30 мл) при КТ при дегазации Ag. Смесь перемешивали в течение 5 мин при дегазации Ag (подповерхностное барботирование), после чего смесь нагревали до 90°C в атмосфере Ag в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до КТ и разбавляли EtOAc (20 мл). Полученную суспензию фильтровали через фритту, содержащую MgSO₄. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением (S)-метил-4-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₇H₁₉O₄S) (ES, m/z): 319[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,28 (с, 1H), 8,10 (с, 1H), 7,66 (с, 1H), 7,05-6,96 (м, 1H), 5,86 (д, J=17,5 Гц, 1H), 5,34 (д, J=11,5 Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,59 (с, 3H), 3,47-3,40 (м, 1H), 3,24-3,16 (м, 1H), 3,00-2,93 (м, 1H), 1,19 (д, J=6,5 Гц, 3H).

Стадия 2. (S)-4-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



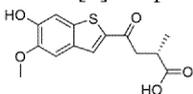
NaOH (1 M в H₂O, 0,41 мл, 0,41 ммоль) добавляли к раствору (S)-метил-4-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (26 мг, 0,082 ммоль) в THF (3,0 мл). Полученную суспензию перемешивали при 20°C в течение 18 ч. Реакционную смесь гасили HCl (1 M в H₂O, 0,41 мл, 0,41 ммоль). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка - неочищенного продукта. Полученный неочищенный остаток очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-4-(6-метокси-5-винилбензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₆H₁₇O₄S) (ES, m/z): 305 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 12,21 (с, 1H), 8,27 (с, 1H), 8,10 (с, 1H), 7,65 (с, 1H), 7,06-6,96 (м, 1H), 5,92-5,81 (м, 1H), 5,38-5,30 (м, 1H), 3,90 (с, 3H), 3,44-3,36 (м, 1H), 3,14-3,05 (м, 1H), 2,93-2,85 (м, 1H), 1,18 (ушир.с, 3H).

Пример 42. (S)-(4R,5R)-5-гидрокси-1,2-дитиан-4-ил 4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат

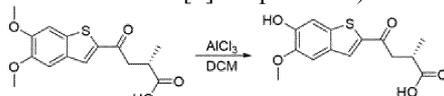


К перемешиваемому раствору (S)-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты (81 мг, 0,26 ммоль) и EDC (50 мг, 0,26 ммоль) в DCM (2,0 мл) добавляли (4R,5R)-1,2-дитиан-4,5-диол (30 мг, 0,20 ммоль) и DMAP (1,6 мг, 0,013 ммоль). Раствор оставляли перемешиваться в течение 3 дней и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex). Желаемые фракции объединяли, концентрировали и повторно очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением (S)-(4R,5R)-5-гидрокси-1,2-дитиан-4-ил-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₉H₂₃O₆S₃) (ES, m/z): 443 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,22 (с, 1H), 7,60 (с, 1H), 7,46 (с, 1H), 5,49 (д, J=5,6 Гц, 1H), 4,66 (м, 1H), 3,86 (с, 3H), 3,83 (с, 3H), 3,60 (м, 1H), 3,40 (дд, J=17,3, 8,3 Гц, 1H), 3,22 (дд, J=17,3, 5,1 Гц, 1H), 3,15-3,09 (м, 2H), 2,98 (м, 1H), 2,89-2,83 (м, 2H), 1,21 (д, J=7,1 Гц, 3H).

Пример 43. (S)-4-(6-гидрокси-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



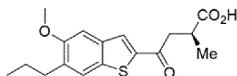
Стадия 1. (S)-4-(6-гидрокси-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



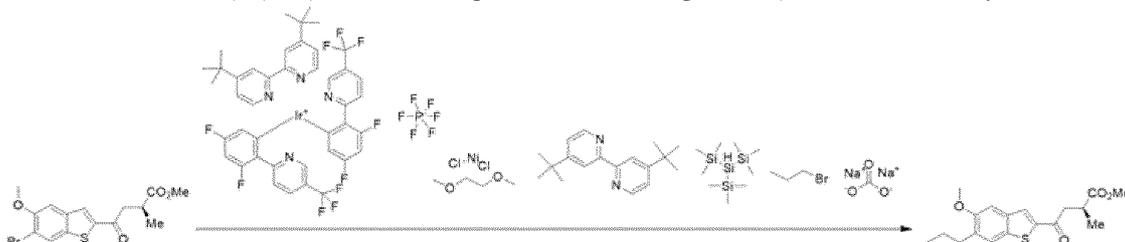
К перемешиваемому раствору (S)-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты (47 мг, 0,15 ммоль) в DCM (2,0 мл) добавляли AlCl₃ (140 мг, 1,10 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 2 ч, концентрировали и очищали преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA). Смесь (S)-4-(6-гидрокси-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты и (S)-4-(5-гидрокси-6-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты повторно очищали хиральной СФХ (колонка AD-H (21×250 мм), 40% MeOH с 0,25% DMEA в CO₂) с получением продукта

(время удерживания 6,2 мин) в виде соли DMEA. Соль растворяли в H₂O и подкисляли 1 н. HCl до pH 2. Осадок фильтровали, промывали H₂O и сушили в глубоком вакууме с получением продукта. ЖХМС (C₁₄H₁₅O₅S) (ES, m/z): 295 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 12,19 (с, 1H), 9,88 (с, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,30 (с, 1H), 3,85 (с, 3H), 3,37 (м, 1H), 3,05 (дд, J=17,1, 5,1 Гц, 1H), 2,88 (м, 1H), 1,17 (д, J=7,1 Гц, 3H).

Пример 44. (2S)-4-(5-метокси-6-пропил-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



Стадия 1. Метил- (2S)-4-(5-метокси-6-пропил-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат

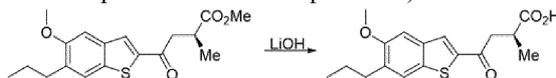


Безводный Na₂CO₃ (16 мг, 0,15 ммоль) нагревали до 125°C в глубоком вакууме в закрытом флаконе для микроволновой печи в течение 1 ч перед использованием. Этот флакон перемещали внутрь перчаточного бокса. Внутри перчаточного бокса дегазированный диметоксиэтан (7,0 мл) добавляли в флакон вместимостью 2 драхмы, содержащий комплекс простого диметилового эфира этиленгликоля/хлорида никеля (II) (5,8 мг) и 4,4'-ди-трет-бутил-2,2'-бипиридин (8,0 мг). Полученную смесь перемешивали в течение 25 мин при КТ для получения раствора А.

Во втором флаконе дегазированный диметоксиэтан (2,4 мл) добавляли в Ir(2-(2,4-дифторфенил)-5-(трифторметил) пиридин)₂ (4,4'-ди-трет-бутил-2,2'-бипиридин) PF₆ (7,2 мг). Полученную смесь перемешивали в течение 10 мин при КТ для получения раствора В.

В третьем флаконе дегазированный диметоксиэтан (0,38 мл) добавляли к смеси метил-(2S)-4-(6-бром-5-метокси-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата (28 мг, 0,075 ммоль) и трис(триметилсилил)силана (23 мкл, 0,075 ммоль). В этот флакон добавляли раствор А (101 мкл), раствор В (280 мкл), 1-бромпропан (28 мг, 0,23 ммоль) и Na₂CO₃ (16 мг, 0,15 ммоль). Флакон закрывали крышкой и герметизировали парафиновой пленкой (парафильм). Реакционную смесь вынимали из перчаточной камеры, перемешивали и облучали двумя 34 Вт синими светодиодными лампами в течение 4 ч. Следует отметить, что лампы были расположены на соответствующем расстоянии от реакционной емкости для обеспечения облучения без нагревания реакционной смеси значительно выше КТ. Неочищенную реакционную смесь, содержащую метил-(2S)-4-(5-метокси-6-пропил-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноат, использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки или характеристики.

Стадия 2. (2S)-4-(5-метокси-6-пропил-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



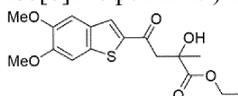
К реакционной смеси метил-(2S)-4-(5-метокси-6-пропил-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутаноата в диметоксиэтаноле (0,76 мл) добавляли MeOH (0,76 мл), H₂O (0,19 мл) и LiOH (22 мг, 0,91 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч при КТ и затем доводили до pH 5 с помощью водн. HCl (2,0 н.) и фильтровали. Фильтрат очищали обращенно-фазовой преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением ((2S)-4-(5-метокси-6-пропил-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₇H₂₁O₄S) (ES, m/z): 321[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,25 (с, 1H), 7,77 (с, 1H), 7,47 (с, 1H), 3,86 (с, 3H), 3,45-3,39 (м, 1H), 3,12-3,07 (м, 1H), 2,92-2,87 (м, 1H), 2,65 (т, J=7,5 Гц, 2H), 1,60 (секстет, J=7,4 Гц, 2H), 1,18 (д, J=7,5 Гц, 3H), 0,91 (т, J=7,3 Гц, 3H).

Примеры 45-47, показанные в табл. 5 ниже, были или могут быть получены согласно процедурам, аналогичным тем, которые описаны выше в примере 44, при использовании соответствующих исходных материалов, описанных в разделах "Получения" или полученных из коммерческих источников.

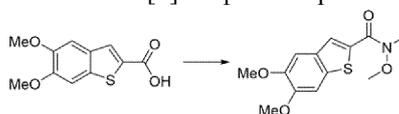
Таблица 5

Прим.	Структура	Наименование	Масса [M+H] ⁺
45		4-[6-(2-фторэтил)-5-метокси-1-бензотиофен-2-ил]-4-оксобутановая кислота	311
46		(2S)-4-[6-(2-фторэтил)-5-метокси-1-бензотиофен-2-ил]-2-метил-4-оксобутановая кислота	325
47		(2S)-4-(6-метокси-5-пропил-1-бензотиофен-2-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота	321

Пример 48. Этил-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-гидрокси-2-метил-4-оксобутаноат

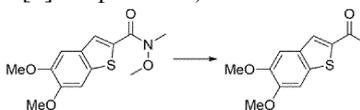


Стадия 1. N,5,6-триметокси-N-метилбензо[b]тиофен-2-карбоксамид



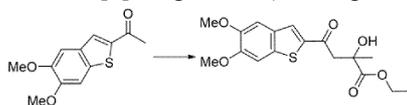
К смеси 5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (2,0 г, 8,4 ммоль) в THF (17 мл) при 0°C добавляли N, O-диметилгидроксиламингидрохлорид (1,6 г, 17 ммоль), EDC (3,2 г, 17 ммоль) и затем основание Ханинга (5,9 мл, 34 ммоль). Смеси давали нагреться до КТ и перемешивали в течение 18 ч. Затем смесь разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением желаемого продукта. ЖХМС (C₁₃H₁₆NO₄S) (ES, m/z): 282[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,05 (с, 1H), 7,55 (с, 1H), 7,49 (с, 1H), 3,84 (с, 3H), 3,81 (с, 3H), 3,80 (с, 3H), 3,30 (с, 3H).

Стадия 2. 1-(5,6-Диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)этан-1-он



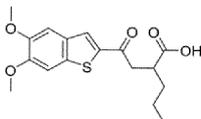
К смеси N,5,6-триметокси-N-метилбензо[b]тиофен-2-карбоксамид (0,20 г, 0,71 ммоль) в THF (3,6 мл) при 0°C медленно добавляли MeMgBr (3,0 М в THF, 0,36 мл, 1,1 ммоль). Через 30 мин при 0°C добавляли еще MeMgBr (3,0 М в THF, 0,10 мл, 0,28 ммоль). Через 15 мин при 0°C добавляли еще MeMgBr (3,0 М в THF, 0,19 мл, 0,57 ммоль). Через 45 мин при 0°C смесь медленно гасили водн. насыщ. NH₄Cl и затем разбавляли EtOAc. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением желаемого продукта. ЖХМС (C₁₂H₁₃O₃S) (ES, m/z): 237 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,15 (с, 1H), 7,59 (с, 1H), 7,46 (с, 1H), 3,85 (с, 3H), 3,83 (с, 3H), 2,58 (с, 3H).

Стадия 3. Этил-4-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-2-гидрокси-2-метил-4-оксобутаноат

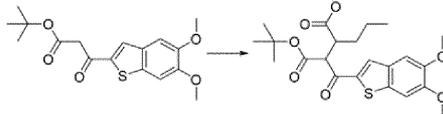


К смеси 1-(5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)этанона (50 мг, 0,21 ммоль) в THF (4,2 мл) при -78°C добавляли LDA (2 М в смеси THF/гептан/бензол, 0,50 мл, 1,0 ммоль). Через 45 мин при -78°C добавляли этилпируват (78 мкл, 0,70 ммоль) и смесь перемешивали в течение 30 мин при -78°C. Через 30 мин смесь гасили насыщ. водн. NH₄Cl и давали нагреться до КТ. Добавляли EtOAc и органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением желаемого продукта в виде рацемической смеси. Очищенную рацемическую смесь затем очищали с помощью хиральной СФХ (ES Industries, Chromega Chiral CCC, колонка 21×250 мм, 40% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением двух соединений со временем удерживания 3,9 и 6,3 мин. Концентрация первого пика элюирования давала продукт. ЖХМС (C₁₇H₂₁O₆S) (ES, m/z): 353 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,16 (с, 1H), 7,59 (с, 1H), 7,46 (с, 1H), 5,39 (с, 1H), 4,08 (кв, J=6, 8 Гц, 2H), 3,85 (с, 3H), 3,83 (с, 3H), 3,47 (д, J=16,0 Гц, 1H), 3,35 (д, J=15, 0 Гц, 1H), 1,40 (с, 3H), 1,16 (т, J=7,1 Гц, 3H).

Пример 49. 2-(2-(5,6-Диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-оксоэтил)пентановая кислота

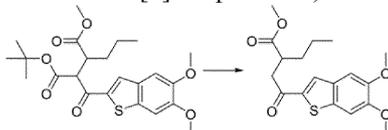


Стадия 1. 1-(трет-бутил)4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонил)-3-пропилсукцинат



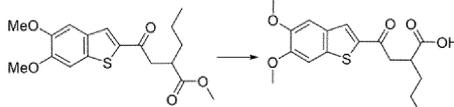
К смеси трет-бутил-3-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноата (0,15 г, 0,45 ммоль) в DMF (4,5 мл) добавляли Cs₂CO₃ (0,29 г, 0,89 ммоль) и смесь перемешивали в течение 20 мин. Через 20 мин добавляли метил-2-бромпентаноат (0,17 г, 0,89 ммоль) и смесь перемешивали в течение 30 мин. Через 30 мин смесь разбавляли EtOAc и насыщенным солевым раствором. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением 1-(трет-бутил)-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонил)-3-пропилсукцината в виде смеси изомеров. ЖХМС (C₂₃H₃₁O₇S) (ES, m/z): 451[M+H]⁺.

Стадия 2. Метил-2-(2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-оксоэтил)пентаноат



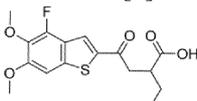
К 1-трет-бутил-4-метил-2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбонил)-3-пропилсукцинату (0,16 г, 0,35 ммоль) в CH₂Cl₂ (0,94 мл) добавляли TFA (0,47 мл) и смесь перемешивали в течение ночи при КТ. Смесь разбавляли EtOAc и насыщ. NaHCO₃. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением метил-2-(2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-оксоэтил)пентаноата. ЖХМС (C₁₈H₂₃O₅S) (ES, m/z): 351[M+H]⁺.

Стадия 3. 2-(2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-оксоэтил)пентановая кислота

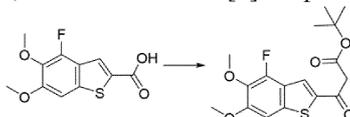


К смеси метил-2-(2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-оксоэтил) пентаноата (69 мг, 0,20 ммоль) в THF (1,0 мл), MeOH (0,50 мл) и H₂O (0,50 мл) добавляли LiOH (24 мг, 0,99 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 ч при КТ. Через 2 ч смесь гасили водн. HCl (2,0 н., 0,5 мл, 1,0 ммоль) и затем разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали хиральной СФХ (Chiralcel, OJ-H, 21×250 мм, 20% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением разделенных энантиомеров с временем удерживания 4,2 и 6,7 мин. Фракции, содержащие первый пик, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Затем остаток растворяли в H₂O и сушили вымораживанием путем лиофилизации с получением 2-(2-(5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-2-оксоэтил)пентановой кислоты. ЖХМС (C₁₇H₂₁O₅S) (ES, m/z): 337[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆): δ 12,02 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 7,55 (с, 1H), 7,42 (с, 1H), 3,82 (с, 3H), 3,79 (с, 3H), 3,36-3,31 (м, 1H), 3,04 (дд, J=17,2, 4,3 Гц, 1H), 2,82-2,76 (м, 1H), 1,59-1,51 (м, 1H), 1,51-1,42 (м, 1H), 1,36-1,26 (м, 2H), 0,85 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Пример 50. 2-Этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота



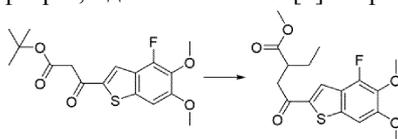
Стадия 1. трет-Бутил-3-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноат



К смеси 4-фтор-5,6-диметоксибензо[*b*]тиофен-2-карбоновой кислоты (290 мг, 1,1 ммоль) в 7,5 мл THF добавляли 1,1'-карбонилдиимдазол (220 мг, 1,4 ммоль). Через 2 ч добавляли 3-(трет-бутокси)-3-оксопропаноат магния (0,58 г, 1,7 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 18 ч. Затем смесь разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и кон-

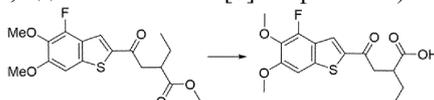
центрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением трет-бутил-3-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноата. ЖХМС ($C_{17}H_{20}FO_5S-C_4H_8$) (ES, m/z): 299 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,32 (с, 1H), 7,60 (с, 1H), 4,13 (с, 2H), 3,92 (с, 3H), 3,85 (с, 3H), 1,40 (с, 9H).

Стадия 2. Метил-2-этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



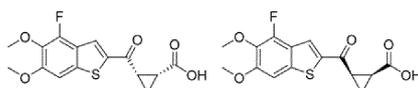
К смеси трет-бутил-3-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-3-оксопропаноата (0,12 г, 0,34 ммоль) в DMF (1,0 мл) добавляли Cs₂CO₃ (0,22 г, 0,68 ммоль) и смесь перемешивали в течение 20 мин. Затем добавляли метил-2-бромбутират (78 мкл, 0,68 ммоль) и смесь перемешивали в течение 3 ч при КТ. Через 3 ч смесь разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. К неочищенному остатку добавляли CH₂Cl₂ (1,7 мл) и TFA (0,85 мл) и смесь нагревали до 50°C в течение 4 ч. После охлаждения до КТ смесь разбавляли EtOAc и насыщ. водн. раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением метил-2-этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС ($C_{17}H_{20}FO_5S$) (ES, m/z): 355 [M+H]⁺.

Стадия 3. 2-Этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

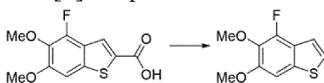


К смеси метил-2-этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (57 мг, 0,16 ммоль) в ТГФ (1,0 мл), MeOH (0,50 мл) и H₂O (0,50 мл) добавляли LiOH (19 мг, 0,80 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 ч при 40°C. Через 2 ч смесь охлаждали до КТ и затем гасили водн. HCl (2,0 M, 0,40 мл, 0,80 ммоль) и затем разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью хиральной СФХ (Lich-4,21×250 мм, 45% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением разделенных энантимеров с временем удерживания 2,8 и 5,3 мин. Фракции, содержащие второй пик, объединяли и концентрировали. Затем остаток растворяли в H₂O и сушили вымораживанием путем лиофилизации с получением 2-этил-4-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($C_{16}H_{18}FO_5S$) (ES, m/z): 341 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 11,97 (с, 1H), 8,35 (с, 1H), 7,57 (с, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,85 (с, 3H), 3,52-3,42 (м, 1H), 3,15-3,07 (м, 1H), 2,81-2,71 (м, 1H), 1,68-1,55 (м, 2H), 0,92 (т, J=7,3 Гц, 3H).

Примеры 51 и 52. (1R,2S)-2-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота и (1S,2R)-2-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота

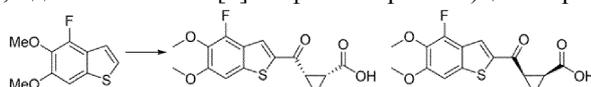


Стадия 1. 4-Фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен



К смеси 4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (0,090 г, 0,35 ммоль) в хинолине (0,83 мл, 7,0 ммоль) добавляли медь (0,038 г, 0,60 ммоль) и смесь нагревали до 190°C в течение 2 ч. Через 2 ч смеси давали возможность остыть до КТ и затем разбавляли EtOAc и 2 н. HCl. Смесь фильтровали и затем органический слой отделяли. Затем органический слой последовательно промывали H₂O, насыщ. водн. NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором. Органический слой сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Смесь очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением 4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофена. ЖХМС ($C_{10}H_{10}FO_2S$) (ES, m/z): 213 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, хлороформ-d): δ 7,33 (д, J=5,4 Гц, 1H), 7,27 (д, J=5,2 Гц, 1H), 7,14 (с, 1H), 3,99 (с, 3H), 3,95 (с, 3H).

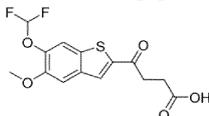
Стадия 2. 2-(4-Фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновая кислота



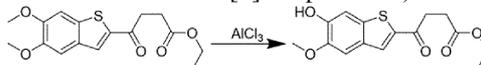
К смеси 4-фтор-5,6-диметоксибензо[b]тиофена (45 мг, 0,21 ммоль) в CH₂Cl₂ (2,0 мл) при 0°C добавляли AlCl₃ (37 мг, 0,28 ммоль) и затем 3-оксабицикло[3.1.0]гексан-2,4-дион (48 мг, 0,42 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 ч при 0°C и затем давали нагреться до КТ и перемешивали в течение 18 ч. Че-

рез 18 ч смесь разбавляли EtOAc и H₂O. Органический слой отделяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением рацемической смеси желаемого продукта. Затем энантимеры разделяли с помощью хиральной СФХ (Lich-4, 21×250 мм, 45% MeOH (+0,25% DMEA) в CO₂) с получением (1R,2S)-2-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновой кислоты и (1S,2R)-2-(4-фтор-5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-карбонил)циклопропан-1-карбоновой кислоты с временем удерживания 4,0 и 4,9 мин. Фракции, содержащие первый пик (время удерживания 4,0 мин), объединяли и концентрировали. Остаток растворяли в H₂O и сушили вымораживанием путем лиофилизации с получением одного из чистых энантимеров. ЖХМС (C₁₅H₁₄FO₅S) (ES, m/z): 325 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,31 (с, 1H), 7,58 (с, 1H), 3,92 (с, 3H), 3,85 (с, 3H), 3,15 (кв, J=8,0 Гц, 1H), 2,33-2,28 (м, 1H), 1,58-1,48 (м, 1H), 1,34-1,27 (м, 1H). Фракции, содержащие второй пик (время удерживания 4,9 мин), объединяли и концентрировали. Остаток растворяли в H₂O и сушили вымораживанием путем лиофилизации с получением одного из чистых энантимеров. ЖХМС (C₁₅H₁₄FO₅S) (ES, m/z): 325 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,18 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 7,58 (с, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,85 (с, 3H), 3,14 (кв, J=7,9 Гц, 1H), 2,29 (кв, J=8,0 Гц, 1H), 1,57-1,49 (м, 1H), 1,34-1,27 (м, 1H).

Пример 53. 4-(6-(Дифторметокси)-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота

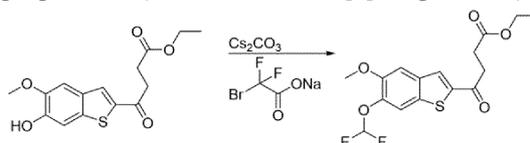


Стадия 1. Этил-4-(6-гидрокси-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



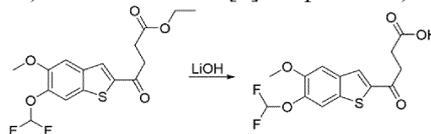
К смеси этил-4-(5,6-диметоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (0,45 г, 1,4 ммоль) и DCM (12 мл) добавляли AlCl₃ (0,56 г, 4,2 ммоль) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 15 ч. Через 15 ч к смеси добавляли еще AlCl₃ (1,0 г, 7,5 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Через 16 ч смесь гасили водн. HCl (1 н., 20 мл, 20 мм) и экстрагировали DCM (3×30 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщенным соевым раствором (20 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в PE) с получением неочищенного этил-4-(6-гидрокси-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. Затем неочищенный продукт очищали с помощью хиральной СФХ с получением этил-4-(6-гидрокси-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₅H₁₇O₅S) (ES, m/z): 309. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,88 (с, 1H), 7,34 (с, 1H), 7,24 (с, 1H), 6,08 (с, 1H), 4,17 (кв, J=7,3 Гц, 2H), 3,99 (с, 3H), 3,31 (т, J=6,7 Гц, 2H), 2,78 (т, J=6,8 Гц, 2H), 1,27 (т, J=7,0 Гц, 3H).

Стадия 2. Этил-4-(6-(дифторметокси)-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноат



К смеси этил-4-(6-гидрокси-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (25 мг, 0,081 ммоль) в DMF (1,5 мл) добавляли 2-бром-2,2-дифторацетат натрия (48 мг, 0,24 ммоль) и Cs₂CO₃ (79 мг, 0,24 ммоль) при 30°C. Полученную смесь нагревали до 100°C в течение 3 ч. После охлаждения до КТ смесь разбавляли H₂O (10 мл) и экстрагировали EtOAc (3×10 мл). Объединенные органические слои промывали H₂O (20 мл) и насыщенным соевым раствором (20 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1% TFA) с получением этил-4-(6-(дифторметокси)-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₆H₁₇F₂O₅S) (ES, m/z): 359 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,90 (с, 1H), 7,61 (с, 1H), 7,34 (с, 1H), 6,60 (т, J=74 Гц, 1H), 4,15 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,31 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,77 (т, J=6,4 Гц, 2H), 1,25 (т, J=7,2 Гц, 3H).

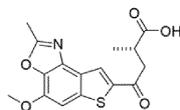
Стадия 3. 4-(6-(Дифторметокси)-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутановая кислота



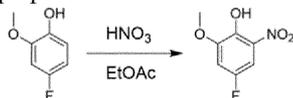
К смеси этил-4-(6-(дифторметокси)-5-метоксибензо[б]тиофен-2-ил)-4-оксобутаноата (5,0 мг, 0,014 ммоль) в MeOH (0,50 мл), THF (0,50 мл) и H₂O (0,50 мл) добавляли LiOH (3,3 мг, 0,14 ммоль). Смесь нагревали до 50°C в течение 2 ч. Через 2 ч смеси давали возможность остыть до КТ и добавляли водн. HCl (1 M) до достижения смесью pH 6. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в DMF (2 мл) и очищали с помощью обращенно-фазовой преп-ВЭЖХ (ACN/H₂O с 0,1%

TFA) с получением 4-(6-(дифторметокси)-5-метоксибензо[b]тиофен-2-ил)-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС ($C_{14}H_{13}F_2O_5S$) (ES, m/z): 331 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,15 (с, 1H), 7,69 (с, 1H), 7,61 (с, 1H), 6,83 (т, J=75 Гц, 1H), 3,96 (с, 3H), 3,36 (т, J=6, 0 Гц, 2H), 2,73 (т, J=6,0 Гц, 2H).

Пример 54. (S)-4-(4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота

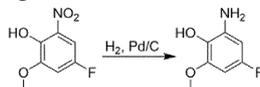


Стадия 1. 4-Фтор-2-метокси-6-нитрофенол



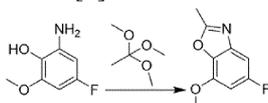
В 50 мл круглодонную колбу добавляли 4-фтор-2-метоксифенол (3,7 мл, 32 ммоль) и EtOAc (90 мл). Смесь охлаждали до 0°C и перемешивали. К перемешиваемой смеси добавляли по каплям азотную кислоту (2,1 мл, 33 ммоль) в течение 5 мин. Реакционную смесь перемешивали при этой температуре в течение 30 мин. Смесь разбавляли EtOAc (30 мл), промывали H₂O (100 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением 4-фтор-2-метокси-6-нитрофенола. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 10,60 (с, 1H), 7,41 (дд, J=8,4, 2,7 Гц, 1H), 6,94 (дд, J=9,2, 2,4 Гц, 1H), 3,97 (с, 3H).

Стадия 2. 2-Амино-4-фтор-6-метоксифенол



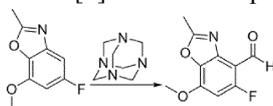
В круглодонную колбу объемом 100 мл добавляли 4-фтор-2-метокси-6-нитрофенол (826 мг, 4,41 ммоль), Pd/C (235 мг, 0,221 ммоль) и EtOAc (30 мл). Смесь перемешивали. Смесь дегазировали N₂, затем помещали в атмосферу H₂. После перемешивания в течение 16 ч реакционную смесь фильтровали через целит и осадок на фильтре промывали EtOAc. Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении с получением 2-амино-4-фтор-6-метоксифенола, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС ($C_7H_9FNO_2$) (ES, m/z): 158 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 6,23-6,01 (м, 2H), 3,85 (с, 3H).

Стадия 3. 5-Фтор-7-метокси-2-метилбензо[d]оксазол



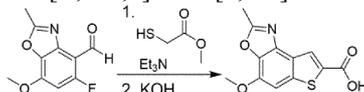
В 20 мл флакон добавляли 2-амино-4-фтор-6-метоксифенол (0,58 г, 3,7 ммоль) и 1,1,1-триметоксиэтан (4,0 мл, 31 ммоль). Смесь перемешивали и нагревали до 70°C. Через 10 мин смеси давали возможность остыть до КТ и растворители выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка, который очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением 5-фтор-7-метокси-2-метилбензо[d]оксазола. ЖХМС ($C_9H_9FNO_2$) (ES, m/z): 182 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 7,05-6,90 (м, 1H), 6,61 (д, J=11,1 Гц, 1H), 4,01 (с, 3H), 2,66 (с, 3H).

Стадия 4. 5-Фтор-7-метокси-2-метилбензо[d]оксазол-4-карбальдегид



В 20 мл флакон добавляли 5-фтор-7-метокси-2-метилбензо[d]оксазол (423 мг, 2,33 ммоль), 1,3,5,7-тетраазаадамantan (556 мг, 3,97 ммоль) и TFA (0,50 мл). Смесь перемешивали и нагревали до 90°C в течение 3 ч. Реакционной смеси давали возможность остыть до КТ, разбавляли EtOAc (40 мл) и распределяли с насыщ. водн. NaHCO₃ (100 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка, который очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением 5-фтор-7-метокси-2-метилбензо[d]оксазол-4-карбальдегида. ЖХМС ($C_{10}H_9FNO_3$) (ES, m/z): 210 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 10,42 (с, 1H), 6,60 (д, J=12,7 Гц, 1H), 4,05 (с, 3H), 2,68 (с, 3H).

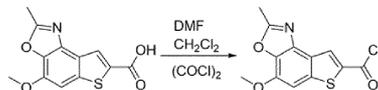
Стадия 5. 4-Метокси-2-метилтиено [2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-карбоновая кислота



В 4 мл флакон добавляли 5-фтор-7-метокси-2-метилбензо[d]оксазол-4-карбальдегид (185 мг, 0,884 ммоль) и ДМСО (4,0 мл). Смесь перемешивали. К смеси добавляли Et₃N (1,2 мл, 8,8 ммоль) и метил-2-

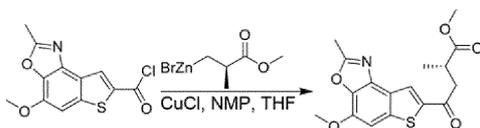
меркаптоацетат (0,79 мл, 8,8 ммоль). Смесь нагревали до 100°C в течение 15 мин. Смеси давали возможность остыть до КТ. Добавляли водн. КОН (10М, 1,8 мл, 18 ммоль) и смесь перемешивали в течение 10 мин. Реакционную смесь подкисляли до pH 3 водн. HCl (6М). Осадок собирали фильтрацией, промывали H₂O (2×20 мл) и затем MeOH (2×2 мл) с получением 4-метокси-2-метилтиено-[2',3':5,6]бензо-[1,2-d]оксазол-7-карбоновой кислоты. ЖХМС (C₁₂H₁₀NO₄S) (ES, m/z) : 264 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 8,05 (с, 1H), 7,05 (с, 1H), 3,82 (с, 3H), 2,47 (с, 3H).

Стадия 6. 4-Метокси-2-метилтиено [2',3':5, 6]бензо[1,2-d]оксазол-7'-карбонилхлорид



В 20 мл флакон добавляли 4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-карбоновую кислоту (106 мг, 0,404 ммоль), CH₂Cl₂ (1,0 мл) и DMF (6,3 мкл, 0,081 ммоль). Смесь перемешивали и охлаждали до 0°C. Добавляли (COCl)₂ (0,074 мл, 0,85 ммоль). Через 5 мин реакционную смесь нагревали до КТ и перемешивали в течение 35 мин. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного 4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-карбонилхлорида, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 2. Метил-(S-4-(4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-ил)-2-метил-4-оксобутаноат



В 20 мл флакон добавляли Cu-Cl (14 мг, 0,15 ммоль). Флакон вакуумировали, затем повторно заполняли N₂ 3 раза. Во флакон добавляли THF (0,25 мл). Смесь охлаждали до 0°C. К перемешиваемой смеси добавляли бромид (R)-(3-метокси-2-метил-3-оксопропил)цинка (II) (0,5М в THF, 1,5 мл, 0,73 ммоль) по каплям в течение 2 мин. Затем смесь перемешивали в течение 10 мин. К смеси добавляли 4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-карбонилхлорид (41 мг, 0,15 ммоль) в виде раствора в NMP (2,0 мл) по каплям в течение 2 мин. Смесь перемешивали в течение 20 мин. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (15 мл) и промывали водн. NH₄OH (3 М, 30 мл, 90 ммоль). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc в Hex) с получением метил-(S)-4-(4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо-[1,2-d]оксазол-7-ил)-2-метил-4-оксобутаноата. ЖХМС (C₁₇H₁₈NO₅S) (ES, m/z): 348[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 8,36 (с, 1H), 7,24 (с, 1H), 4,11 (с, 3H), 3,73 (с, 3H), 3,54 (дд, J=16,6, 7,5 Гц, 1H), 3,20-3,09 (м, 2H), 2,78 (с, 3H), 1,32 (д, J=7,0 Гц, 3H).

Стадия 8. (S)-4-(4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-ил)-2-метил-4-оксобутановая кислота



В 4 мл флакон добавляли (S)-метил-4-(4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]-бензо[1,2-d]оксазол-7-ил)-2-метил-4-оксобутаноат (48 мг, 0,14 ммоль), водн. КОН (0,5М, 0,55 мл, 0,28 ммоль) и 2-пропанол (1,4 мл) при КТ. Через 30 мин смесь подкисляли до pH 3 водн. HCl. Осадок собирали фильтрацией и промывали H₂O (2×5 мл) и MeOH (2 мл). Осадок далее очищали хроматографией на силикагеле (MeOH в DCM) с получением (S)-4-(4-метокси-2-метилтиено[2',3':5,6]бензо[1,2-d]оксазол-7-ил)-2-метил-4-оксобутановой кислоты. ЖХМС (C₁₆H₁₆NO₅S) (ES, m/z): 334[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,20 (с, 1H), 8,51 (с, 1H), 7,70 (с, 1H), 4,04 (с, 3H), 3,51 (дд, J=17,4, 8,6 Гц, 1H), 3,18 (дд, J=17,5, 4,9 Гц, 1H), 2,95-2,85 (м, 1H), 2,71 (с, 3H), 1,20 (д, J=7,2 Гц, 3H).

Биологическая оценка.

Отдельные соединения, описанные в приведенных в настоящем описании примерах, определены как агонисты STING по результатам (i) связывания с белком STING, что подтверждено с помощью снижения уровня связывания обогащенного тритием лиганда cGAMP с белком STING по меньшей мере на 20% при 20 мкМ (концентрация тестируемого соединения) в биохимическом анализе конкурентного связывания [³H]cGAMP со STING, и (ii) демонстрации выработки интерферона с индукцией секреции IFN-β 6% или более при 30 мкМ в анализе с использованием клеток THP1 (где индукция, вызванная cGAMP при 30 мкМ, составляла 100%).

Синтез [³H]-cGAMP.

2,3 мл буферного раствора, содержащего 80 мМ Трис-Cl, 200 мМ MgCl₂ и 20 мМ NaCl с последующим добавлением 0,32 мл 10 мМ водн. раствора GTP, добавляли в 50 мл пластиковую пробирку AMICON. Затем добавляли раствор [³H]ATP (21 Ки/ммоль, 45 мКи) в 0,5 мл H₂O, после чего добавляли 1 мл раствора 1 мг/мл ДНК (ДНК активатор из семенников сельди, Sigma, #D6898) и 53 мкл 47 мМ раствора

фермента cGAS. Добавляли дополнительное количество H₂O для доведения общего объема до 10 мл.

Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 37°C и затем сразу добавляли в центрифужную пробирку Amicon Ultra-15 10K и центрифугировали в течение 1 ч при 4000×g. Затем собранный раствор очищали на полупрепаративной колонке Mono Q, используя следующие подвижные фазы:

А: 0,05 М Трис-Cl с pH 8,5, доведенным 1 М NaOH.

В: 0,05 М Трис-Cl, 0,5М NaCl с pH 8,5, доведенным 1 М NaOH.

Градиент: 100% А в течение 5 мин, за которым следовал линейный градиент 50:50 (А:В) в течение 25 мин, 3 мл/мин, 254 нм.

Собранные фракции продукта сливали вместе, и общий объем доводили до 30 мл буфером А. Общий выход 15,5 мКи [³H]cGAMP выделяли с радиохимической чистотой 98,0% при удельной активности 21,5 Ки/ммоль.

Фермент cGAS.

Рекомбинантный ДНК-вектор химически синтезировали для экспрессии укороченного человеческого фермента cGAS (остатки 161-522). Для облегчения экспрессии и очистки аминоконец содержал гексистициновую метку, метку SUMO и сайт расщепления TEV. Сверхэкспрессию рекомбинантного фермента осуществляли в компетентных клетках Rosetta™ 2(DE3) Single (Novagen). Аффинную очистку проводили с использованием HIS-Select HF Nickel Affinity Gel (Sigma) с последующей эксклюзионной хроматографией, используя препаративную колонку Hi-Load 26/60 Superdex200 (GE Healthcare). Фракции объединяли, концентрировали, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до необходимости.

Пример 55. Фильтрационное связывание ³H-cGAMP (HAQ STING).

Способность соединений связывать STING определяли количественно по их способности конкурировать с обогащенным тритием лигандом cGAMP за связывание с мембраной с человеческими рецепторами STING в анализе связывания на фильтрах с радиоактивностью. В анализе связывания использовали рецептор STING, полученный из клеточных мембран *Trichoplusia ni* (T.ni; Expression Systems, кат. № 94-002F, www.expressionsystems.com), сверхэкспрессирующих полноразмерный HAQ STING и обогащенный тритием лиганд cGAMP.

Базовая методика фильтрационного анализа HAQ STING выглядит следующим образом:

Соединения последовательно титровали с помощью Hamilton STARplus CORE в 96-луночном планшете (Greiner, № 651201), используя 10-точечный формат ответа на дозу 1:3. После приготовления соединения получали рабочую концентрацию 2,2 мкг/мл мембраны со STING (SEQ. ID. No. 1) путем разбавления концентрированной мембраны в аналитическом буфере (1×PBS; Invitrogen, № SH30028.02) и гомогенизации 7×, используя ручной гомогенизатор тканей (Wheaton, № 357546). Затем по 148 мкл приготовленной мембраны вручную добавляли в каждую лунку 96-луночного полипропиленового планшета с глубокими лунками (Fisher Scientific, № 12-566-121). После добавления мембраны по 2 мкл оттитрованного тестируемого соединения, контроль ДМСО (Sigma, № 276855) или же контроль охлажденного cGAMP, добавляли в соответствующие лунки, используя Biomek FX. Соединение и мембрану затем предварительно инкубировали в течение 60 мин при КТ, чтобы обеспечить равновесное связывание соединения. После достижения равновесия готовили 8 нМ раствор [³H]c-GAMP лиганда путем разведения в аналитическом буфере, и по 50 мкл этого рабочего раствора затем вручную добавляли в каждую лунку аналитического планшета. Затем планшеты инкубировали при КТ в течение 60 мин, и затем содержимое каждого аналитического планшета фильтровали через 96-луночный GF/B фильтровальный планшет (PerkinElmer, № 6005250), используя харвестер клеток TomTec Mach II, содержащий 20 mM HEPES буфера (Fisher Scientific, № BP299500). Затем фильтровальные планшеты сушили при 55°C в течение 30 мин, используя печь под давлением, перед добавлением в каждую лунку по 30 мкл сцинтиллятора Ultima Gold F. Уровни трития в каждой реакционной лунке затем измеряли с использованием планшет-ридера PerkinElmer TopCount.

После нормализации к контролям вычисляли процент активности для каждой концентрации соединения путем измерения количества оставшейся радиоактивности. График зависимости активности в процентах от логарифма концентрации соединения аппроксимировали с помощью 4-параметрического уравнения "доза-ответ" для вычисления значений EC₅₀.

Конечные условия реакции были следующими:

Компонент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
Мембрана со STING	148	1,5 мкг/мл
³ H-cGAMP	50	2,0 нМ
Низкий контроль (холодный cGAMP)	2	10 мкМ
Тестируемое соединение/ДМСО	2	10 мкМ

Концентрации тестируемых соединений были следующими: 20,000, 637,00, 2,200, 0,740, 0,247, 0,082, 0,027, 0,009, 0,003 и 0,001 мкМ с 1,0% остаточным ДМСО.

Генерирование полноразмерного вируса с STING (HAQ).

Вирус STING получали на основе бакуловирусной системы насекомых. Клетки *Spodoptera frugiperda* Sf21 (Kempbio, Inc.) разбавляли до 5×10^5 клеток/мл в средах Sf-900II SFM (LifeTechnologies, № 10902088) без антибиотиков. Клеточную суспензию добавляли в каждую лунку обработанного 6-луночного планшета (2 мл на лунку, всего 1×10^6 клеток), и обеспечивали адгезию клеток в течение по меньшей мере 30 мин. В то же время готовили 1 мл смеси для совместной трансфекции путем объединения 500 нг ДНК HAQ STING [STING(1-379)R71H,G230A,H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8/pBAC1] (синтез Genewiz) с 1 мл сред Sf-900II SFM, содержащих 10 мкл реагента Cellfectin® II (Invitrogen, № 10362100) и 100 нг линейризованной ДНК бакуловируса с удаленными ν -cath/chiA из вирусного остова BestBac 2,0 (Expression Systems, № 91-002). Смеси для трансфекции инкубировали в течение 30 мин. После инкубации осторожно удаляли среду из 6-луночного планшета с прикрепившимися клетками и добавляли по 1 мл смесей для трансфекции (1 мл на лунку), и планшет помещали во влажный инкубатор при 27°C. На следующий день 1 мл среды Sf-900II SFM (без антибиотиков) добавляли в каждую лунку 6-луночного планшета. После добавления среды клеткам давали возможность инкубироваться с ДНК (SEQ ID No. 2) при 27°C в течение 5-7 дней для получения вирусного маточного раствора P0. Для получения вирусного маточного раствора P1 добавляли по 0,5 мл вирусного супернатанта P0 к 50 мл незараженных клеток Sf21 (посев которых с плотностью 5×10^5 клеток/мл производили за день до заражения, чтобы обеспечить однократное удвоение) в среде SF-900II SFM, содержащей 5 мкг/мл гентамицина (Invitrogen, № 15710072). Затем инфицированные клетки инкубировали при 27°C в течение 3 дней при встряхивании со скоростью 110 об/мин (ATR Biotech Multitron Infors HT #AJ118). На 3-й день культуры P1 подсчитывали с помощью ViCell XR (Beckman Coulter Life Sciences, № 383556) для подтверждения того, что произошло инфицирование (размер клеток на >3 мкм больше, чем у неинфицированных клеток, и жизнеспособность приблизительно 85-95%). Культуры собирали в 50 мл конические пробирки и центрифугировали при $200 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. Вирусные супернатанты P1 переливали в чистые 50 мл центрифужные пробирки, а оставшийся клеточный осадок P1 использовали для получения клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом (ВПС). Готовили среды для криоконсервации, содержащие среду Sf-900II SFM с 10% инактивированной нагреванием FBS, 10% ДМСО (Sigma, № D2650) и 5 мкг/мл гентамицина, и стерилизовали через 0,22 мкм фильтр непосредственно перед использованием. Клеточный осадок P1 ресуспендировали до плотности 2×10^7 клеток/мл и аликвотировали в криопробирки (1 мл на пробирку). Криопробирки помещали в морозильные камеры Mr. Frosty™ O/N при -80°C и переносили в жидкий азот для длительного хранения на следующий день. Для получения вирусного маточного раствора P2 добавляли по 0,5 мл вирусного супернатанта P1 к 50 мл незараженных клеток Sf21 (посев которых с плотностью 5×10^5 клеток/мл осуществляли за день до заражения, чтобы обеспечить однократное удвоение) в среде SF-900II SFM, содержащей 5 мкг/мл гентамицина. Эти клетки инкубировали при 27°C в течение 3 дней при встряхивании со скоростью 110 об/мин перед сбором маточного материала P2 путем центрифугирования при $2000 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. Вирусные супернатанты P2 выливали и отбрасывали, тогда как клеточный осадок P2 использовали для получения P2 ВПС согласно той же методике, описанной выше. Методику получения бакуловируса валидировали для устойчивого получения P1/P2 ВПС с титрами 2×10^9 БОЕ/мл (2×10^7 клеток/мл $\times 100$ БОЕ/клетка).

Экспрессия полноразмерного STING (HAQ).

Для создания мембран STING в течение ночи амплифицировали ВПС P1/P2 путем добавления замороженных ВПС к клеткам Sf21, высеянным с плотностью $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Этот объем ВПС, используемый для заражения культуры, рассчитывали, исходя из предполагаемого титра ВПС 2×10^9 БОЕ/мл для достижения MOI=10 при амплификации в течение ночи. После культивирования в течение ночи клетки подсчитывали на ViCell XR для подтверждения того, что инфицирование произошло (размер клетки на >3 мкм больше, чем у неинфицированных клеток, и жизнеспособность приблизительно 80-90%). Объем инфицированных клеток Sf21 после амплификации в течение ночи, используемый для заражения больших количеств экспрессирующих *Trichoplusia ni* (T.ni; Expression Systems, кат. № 94-002F, www.expressionsystems.com), высевали с плотностью $1,0 \times 10^6$ в клеточных средах (ESF921 SFM, содержащих 5 мкг/мл гентамицина) при MOI=2,0, рассчитанной, исходя из (100 БОЕ/инфицированные клетки Sf21). Клетки оставляли для экспрессии на 48 ч при 27°C перед сбором клеточного осадка центрифугированием при $3400 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. T. ni клетки подсчитывали на ViCell XR для подтверждения того, что инфицирование произошло (размер клеток на ≥ 3 мкм больше, чем у неинфицированных клеток, и жизнеспособность приблизительно 80-90%), перед сбором.

Получение мембраны с полноразмерным STING (HAQ).

Маточные буферные реагенты:

- 1) 1 М HEPES pH 7,5, Teknova, кат. № H1035;
- 2) 5 М NaCl, Sigma Aldrich, кат. № S5150-1L;
- 3) KCl, Sirma Aldrich, кат. № 319309-500ML;
- 4) таблетки, содержащие полный набор ингибиторов протеаз без EDTA, Roche Diagnostics, кат.

№ 11873580001;

5) бензоназа, Universal Nuclease, Pierce, кат. № 88702.

Лизирующий буфер [25 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, (бензоназа 1:5000, таблетка с полным набором ингибиторов протеаз/50 мл)] добавляли к осадку клеток, экспрессирующих полноразмерный STING (HAQ), полученный выше, в количестве 5 мл лизирующего буфера на 1 г клеточного осадка. Осадок ресуспендировали и гомогенизировали 20 раз с помощью гомогенизатора Wheaton Dounce для разрушения клеточной мембраны. Затем гомогенизированный лизат пропускали через микрофлюидизатор Emulsiflex-C5 под давлением, близким к 5000 фунт/кв. дюйм (34,5 МПа). Ресуспендированный клеточный осадок центрифугировали при 36000 об/мин (100000×g) в высокоскоростной центрифуге с ротором 45Ti в течение 45 мин при 4°C. Супернатант удаляли. Затем осадок ресуспендировали в промывочном буфере [(25 mM HEPES pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 1 M NaCl (таблетка с полным набором ингибиторов протеаз/50 мл)] в объеме 50 мл клеточного осадка/центрифужная пробирка. Затем смесь клеточный осадок/промывочный буфер гомогенизировали, используя стеклянный гомогенизатор на льду (20 циклов) с последующим центрифугированием при 36000 об/мин в течение 4 5 мин при 4°C. Супернатант удаляли. Стадию промывки повторяли еще раз. Полученную мембрану ресуспендировали в 20 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% глицерина, ингибиторов протеазы без ЭДТА (1 таблетка/50 мл). Концентрацию белка измеряли с помощью анализа по Брэдфорду (Bio-Rad Protein Assay, кат. № 500-0006), и обогачивание белком определяли методом SDS-PAGE и подтверждали вестерн-блоттингом. Ресуспендированные мембраны хранили при -80°C.

Аминокислотная последовательность полноразмерного HAQ STING [STING (1-379) R71H,G230A,H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8]:

```
MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVLTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLL
LNGVCSLAEELHHIHSRYRGSYWRVTRACLGCPLRRGALLLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLAL
LGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYIIGYLRLLPELQARIRTYNQHYN
NLLRGAVSQRLYIILLPLDCGVFDNLSMADPNIRFLDKLPQQTADRAGIKDRVYSNSIYELLENG
QRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCQTLLEDILADAPESQNNCRLLIAYQ
EPADSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSCLKTSVAVPSTSTMSQPELLISGMEKPLPLRTDFS
GGGLNDIFEAQKIEWHEGSLVLFQGGPHNNHHHHH (SEQ. ID. No. 1)
```

Последовательность плазмидной ДНК для полноразмерного HAQ STING [STING (1-379) R71H,G230A,H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8/pBAC1]:

```
GGAACGGCTCCGCCACTATTAATGAAATTAATAATTCGAATTTAAAAACCGCAGCAA
GAGAAACATTTGTATGAAAGAATGCGTAGAAGGAAAGAAAAATGTCGTCGACATGCTGAACAA
AAGATTAATATGCCTCCGTGTATAAAAAAATATGAACGATTTGAAAGAAAACAATGTACCGC
CGCGCGGTATGTACAGGAAGAGTTTATACTAACTGTTACATTCGCAACCGTGGTTTCGTGTGC
CAAGTGTGAAAACCGATGTTAATCAAGGCTCTGACGCATTTCTACAACCCAGACTCCAAGTGT
GTGGGTGAAGTCATGCATCTTTAATCAAATCCCAAGATGTGTATAAACCCACCAAACTGCCAAA
AAATGAAAACGTGTCGACAGCTCTGTCGGTTGCTGGCAACTGCAAGGGTCTCAATCCTATTTG
TAATTTAATAATAAACAATATAAATGCTAATTTGTTTTTATTAAAGTACAAACCAA
ACGCAACAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAATGAAAACCGCTAGTTATAATCGCTGAGGTA
ATATTTAAATCATTTCAAATGATTCACAGTTAATTTGCGACAATAAATTTTATTTTCACAT
AACTAGACGGCTTGTCTCTCTTCTCGTATTCCTTCTTTTCATTTTCTCTCATAAAA
AATTAACATAGTTATATCGTATCCATATATGTATCTATCGTATAGAGTAAATTTTGTGTCT
ATAAATATATATGCTTTTTTAATGGGGTGTATAGTACCGCTGCGCATAGTTTCTGTAATTT
ACAACAGTGTATTTCTGGTAGTCTTCGGAGTGTGTGCTTTAATATTAATTTATATAAT
CAATGAAATTTGGGATCGTGGTTTGTACAATATGTTCCGGCATAGTACGACGCTTCTCTAG
TTCAATTACACCATTTTTAGCAGCACCGGATTAACATAACTTTCCAAAATGTTGTACGAACCG
TTAAACAAAACAGTTCACCTCCCTTTCTATACTATTCTCTGCGAGCAGTTGTTTGTGTTAA
AAATAACAGCCATGTAATGAGACGCACAACATAATACAAAACGGAAATGTCTATCAATAT
ATAGTTGCTGATCAGATCTGATCATGGAGATAATTAATGATAACCATCTCGCAATAAATAA
GTATTTTACTGTTTTCTGTAACAGTTTGTAAATAAAAAACCTATAAATAATAGGATCCATGCCCC
ACTCCAGCTGCATCCATCCATCCCGTGTCCAGGGGTACGGGGCCAGAGGAGCCCTTGGT
TCTGCTGAGTGCCTGCCTGGTACCCCTTGGGGGTAGGAGAGCCACCAGAGCACACTCTCCGG
TACCTGGTGTCCACCTAGCCTCCCTGCAGCTGGGACTGCTGTTAAACGGGGTCTGACGCTGG
CTGAGGAGCTGCACCACATCCATCCAGGTACCGGGCAGCTACTGGAGGACTGTGCGGGCTG
CCTGGGCTGCCCCCTCCGCCGTGGGGCCCTGTGCTGTCCATATTTCTACTACTCCCTC
CCAAATGCGGTGCGCCCGCCCTCACTTGGATGCTTGCCCTCTGGGCTCTCGCAGGCACTGA
ACATCCTCCTGGGCTCAAGGGCTGGCCCGCTGAGATCTCTGAGTGTGTGAAAAGGGAA
TTTTCAACGTGGCCATGGGCTGGCATGGTCATATACATCGGATATCTCGGCTGATCCTGCCA
GAGCTCCAGGCCCGGATTCGAACCTACAATCAGCATTACAACAACCTGCTACGGGGTGCAGTGA
GCCAGCGGCTGTATATCTCTCCCATTTGGACTGTGGGGTGCCTGATAACCTGAGTATGGCTGA
CCCCAACATTCGTTCTGGATAAACTGCCCCAGCAGACCCGCTGACCGTGTGGCATCAAGGAT
CGGGTTTACAGCAACAGCATCTATGAGCTTCTGGAGAACGGGCAGCGGGCGGGCACCTGTGTCC
TGGAGTACGCCACCCCTTGCAGACTTTGTTTGGCATGTCAAAATACAGTCAAGCTGGCTTTAG
CCGGGAGGATAGGCTTGAGCAGGCCAACTCTTCTGCCAGACACTTGAGGACATCCTGGCAGAT
```

GCCCTGAGTCTCAGAACACTGCCGCTCATTGCCTACCAGGAACCTGCAGATGACAGCAGCT
 TCTCGCTGTCCAGGAGGTTCTCCGGCACCTCGCGCAGGAGGAAAAAGGAGGTTACTGTGGG
 CAGCTTGAAGACCTCAGCGGTGCCAGTACCTCCACGATGTCCTCAAGAGCCTGAGCTCCTCATC
 AGTGAATGGAAAAGCCCTCCCTCTCCGCACGGATTCTCTGGCGTGGCTGAACGACATCT
 TCGAAGCCAGAAAATCGAATGGCATGAAGGCAGCCTGGAAGTGTGTTCCAGGGCCACACCA
 CCATCATCACCATCACCATTAAATGAGCGGCCACTCGAGCACCACCACCACCACCTAACCT
 AGGTAGCTGAGCGCATGCAAGCTGATCCGGTTATTAGTACATTTATTAAGCGTAGATTCTGT
 GCGTTGTGATTACAGACAATTGTTGTACGATTTTAAATAATTCATTAATTTATAATCTTTA
 GGTGGTATGTTAGAGCGAAAATCAAATGATTTTCAGCGCTTTTATATCTGAATTTAAATATTA
 AATCCTCAATAGATTTGTAATAATAGTTTCGATTAGTTTCAAACAAGGGTGTGTTTCCGAACC
 GATGGCTGGACTATCTAATGGATTTTCGCTCAACGCCACAAAACCTTGCCAAATCTGTAGCAGC
 AATCTAGCTTTGTCGATATTCGTTGTGTTTGTGTTTGTAAATAAGGTTGACGCTGTTCAAAA
 TATTATGCGCTTTGTATTCTTTCATCACTGTCGTTAGTGACAATTGACTCGACGTAAACAC
 GTTAAATAGAGCTTGGACATATTTAACATCGGGCGTGTAGCTTTATTAGGCCGATTATCGTCG
 TCGTCCCAACCTCGTCGTTAGAAGTGTCTCCGAAGCAGATTTGCCATAGCCACGACGCGC
 TATTAATGTGTGCGCTAACACGTCGCGCATCAAATTTGTAGTTGAGCTTTTGGAAATATTTC
 TGATTGCGGGCGTTTTGGGGCGGTTTCAATCTAACTGTGCCGATTTTAAATTCAGACAACAG
 TTAGAAAGCGATGGTGCAGGCGGTGTAACATTCAGACGGCAAATCTACTAATGGCGGGGTG
 GTGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGAGGCGCAGGGCGGGCTGGCGCGGAGGCGGAGG
 CGGAGGTGTGGCGGTGATGACAGCGCGGTTTAGGCTCAAATGTCTTTTAGGCAACACAGTC
 GGCACCTCAACTATTGTAAGTGTGTTCCGGCGCGGTTTTGGTTGACCGGCTGAGACGAGTGC
 GATTTTTTTCGTTTCAATAGCTTCCAACAATTTGTCTGCTGCTAAAGGTGCAGCGGGTTC
 AGGTTCCGTCGCGATTGGTGGAGCGGGCGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGTGGGA
 GCGCTGGAATGTTAGGCACGGGAGAAGTGGTGGCGCGGTGCCCGGTATAATTTGTCTG
 GTTTAGTTTGTTCGCGCACGATTTGGGCGCCGCGCAGGGCGCGCTGGCTGCACACGGAAGG
 TCGCTGCTTCGAGGCGCGCTTGGGGTGGTGGCAATCAATATTTAATAATGGAATACAAATCG
 TAAAAATCTGCTATAAGCATTGTAATTTTCGCTATCGTTTACCGTCCGATATTTAAACACCGCT
 CAATGTAAGCAATTTGATTTGTAAGAGATTTGCTCAAGCTCGGATCGATCCCGCAGCGGATAA
 CAAGCCTTTTCAATTTTACTACAGCATTGTAGTGGCGAGACACTTCGCTGTCGAGGTTTAA
 ACGCTTCCCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGTGCAGGCGAGCGGTATCAGCTCA
 CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAGAAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCA
 AAAGGCCAGAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC
 GCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
 ATAAAGATACAGCGGTTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCTCGCG
 CTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
 GTAGGTATCTCAGTTGCGTGTAGTGTGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCT
 TCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAATATCGTCTTGTAGTCCAAACCGGTAAGACAGGAC
 TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
 CAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGC
 TCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGTGTGAGTCTTGTATCCGGCAACAACACCACC
 GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG
 AAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGAT
 TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTT
 AAATCAATCTAAGTATATAGATAAATTTGCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGG
 CACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGCTGTAGAT
 AACTACGATACGGGAGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGGAGACCCACGC
 TCACCGGCTCAGATTATCAGCAATAAACACGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTC
 CTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTGCGGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTC
 GCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGATCGTGGTGTACGCTCGTGTG
 TTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGGAGTTACATGATCCCCCATGT
 TGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGTTCCCGATCGTGTGCAAGTAAGTTGGCCGCGAT
 GTTACTCATGTTGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGC
 TTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTATTCTGAGAATAGTGTATCGCGGACCGGAT
 GCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGTCTAT
 CATTTGGAACAGTCTTTCGGGGGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTTCG
 ATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTTCGGGT
 GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAAT
 ACTCATACTTCTCTTTTCAATATTTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGA
 TACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAATAAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAG
 TGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGT
 GACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTTCGCGC
 ACGTTCCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGATTTAGTG
 CTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGAATAGGGTGTGTTTACGTTAGTGGCCATCGCC
 CTGATAGACGGTTTTTCGCTTTGACGTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGACTCTGTTC
 CAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGTCTATTTTGTATTATAAGGGATTTTGCCTGA
 TTTCCGCTTATGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTTTAAACAAAT
 ATTAACGTTTCAATTTCCATTCGCCATTCAGGCTGCACAATGTTGGGAAGGGCGATCGGTG
 CGGGCTCTTCGCTATTACGCCA

(SEQ. ID. No. 2)

Конкретные соединения по изобретению оценивали в анализе *in vitro* связывания HAQ STING, как описано выше. В следующей ниже таблице приведены биологические данные для этих соединений в ви-

де значений EC₅₀.

Таблица 6
Фильтрационное связывание ³H-cGAMP HAQ STING

Соединение	EC ₅₀ (нМ)	Соединение	EC ₅₀ (нМ)	Соединение	EC ₅₀ (нМ)
Пример 1	3405	Пример 19	9705	Пример 37	5612
Пример 2	9587	Пример 20	10720	Пример 38	1926
Пример 3	10640	Пример 21	6341	Пример 39	1146
Пример 4	1903	Пример 22	8808	Пример 40	3938
Пример 5	1143	Пример 23	6054	Пример 41	5700
Пример 6	703	Пример 24	2636	Пример 42	759
Пример 7	9335	Пример 25	4073	Пример 43	1197
Пример 8	6773	Пример 26	1375	Пример 44	15740
Пример 9	2575	Пример 27	13170	Пример 45	14670
Пример 10	13980	Пример 28	1952	Пример 46	7454
Пример 11	2735	Пример 29	13760	Пример 47	5056
Пример 12	5990	Пример 30	5050	Пример 48	19250
Пример 13	1375	Пример 31	5943	Пример 49	2718
Пример 14	4073	Пример 32	3627	Пример 50	890
Пример 15	894	Пример 33	6461	Пример 51	17840
Пример 16	1720	Пример 34	10420	Пример 52	599
Пример 17	5865	Пример 35	5547	Пример 53	13670
Пример 18	12500	Пример 36	14430	Пример 54	531

Пример 56: Фильтрационное связывание ³H-cGAMP (WT STING).

Способность соединений связывать STING определяли количественно по их способности конкурировать с обогащенным тритием лигандом cGAMP за связывание с мембраной с человеческими рецепторами STING в анализе связывания на фильтрах с радиоактивностью. В анализе связывания использовали рецептор STING, полученный из клеточных мембран *Trichoplusia ni* [T.ni; Expression Systems, кат. № 94-002F, www.expressionsystems.com), сверхэкспрессирующих полноразмерный WT STING и обогащенный тритием лиганд cGAMP.

Базовая методика фильтрационного анализа WT STING выглядит следующим образом:

Готовили 16 нМ раствор [³H]c-GAMP лиганда путем разбавления аналитическим буфером, и по 50 мкл этого рабочего раствора вручную добавляли в каждую лунку аналитического планшета. После добавления лиганда, по 2 мкл оттитрованного тестируемого соединения, контроль ДМСО (Sigma, № 276855) или же контроль охлажденного cGAMP, добавляли в соответствующие лунки, используя Biomek FX. Последовательно титрованное соединение получали с помощью Hamilton STARPlus CORE в 96-луночном планшете (Greiner, № 651201), используя 10-точечный формат ответа на дозу 1:3. После добавления соединения получали рабочую концентрацию 2,2 мкг/мл мембраны со STING (SEQ. ID. No. 3) путем разбавления концентрированной мембраны в аналитическом буфере (1× PBS; Invitrogen, № SH30028.02) и гомогенизации 7×, используя ручной гомогенизатор тканей (Wheaton, № 357546). Затем в каждую лунку 96-луночного полипропиленового планшета с глубокими лунками (Fisher Scientific, № 12-566-121) вручную добавляли по 148 мкл этой приготовленной мембраны. Соединение, лиганд и мембрану затем инкубировали в течение 60 мин при КТ, и затем содержимое каждого аналитического планшета фильтровали через 96-луночный GF/B фильтровальный планшет (PerkinElmer, № 6005250), используя харвестер клеток TomTec Mach III, содержащий 20 мМ HEPES буфера (Fisher Scientific, № BP299500). Затем фильтровальные планшеты сушили при 55°C в течение 30 мин, используя VWR печь под давлением, перед добавлением в каждую лунку по 30 мкл сцинтиллятора Ultima Gold F. Уровни трития в каждой реакционной лунке затем измеряли с использованием планшет-ридера PerkinElmer Top-Count.

После нормализации к контролям вычисляли процент активности для каждой концентрации соединения путем измерения количества оставшейся радиоактивности. График зависимости активности в процентах от логарифма концентрации соединения аппроксимировали с помощью 4-параметрического уравнения "доза-ответ" для вычисления значений EC₅₀.

Конечные условия реакции были следующими:

Компонент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
Мембрана со STING	148	1,5 мкг/мл
³ H-cGAMP	50	4,0 нМ
Низкий контроль (холодный cGAMP)	2	10 мкМ
Тестируемое соединение/ДМСО	2	10 мкМ

Концентрации тестируемых соединений были следующими: 20,000, 637,00, 2,200, 0,740, 0,247, 0,082, 0,027, 0,009, 0,003 и 0,001 мкМ с 1,0% остаточным ДМСО.

Генерирование полноразмерного вируса с STING (WT).

Вирус STING получали на основе бакуловиральной системы насекомых. Клетки *Spodoptera frugiperda* Sf21 (Kempbio, Inc.) разбавляли до 5×10^5 клеток/мл в средах Sf-900II SFM (LifeTechnologies, № 10902088) без антибиотиков. Клеточную суспензию добавляли в каждую лунку обработанного 6-луночного планшета (2 мл на лунку, всего 1×10^6 клеток) и обеспечивали адгезию клеток в течение по меньшей мере 30 мин. В то же время готовили 1 мл смеси для совместной трансфекции путем объединения 500 нг ДНК WT STING [STING(1-379)H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8/pBAC1] (синтез Genewiz) с 1 мл сред Sf-900II SFM, содержащих 10 мкл реагента Cellfectin® II (Invitrogen, № 10362100) и 100 нг линейаризованной ДНК бакуловируса с удаленными γ -cath/chiA из вирусного остова BestBac 2,0 (Expression Systems, № 91-002). Смеси для трансфекции инкубировали в течение 30 мин. После инкубации осторожно удаляли среду из 6-луночного планшета с прикрепившимися клетками и добавляли по 1 мл смесей для трансфекции (1 мл на лунку), и планшет помещали во влажный инкубатор при 27°C. На следующий день 1 мл среды Sf-900II SFM (без антибиотиков) добавляли в каждую лунку 6-луночного планшета. После добавления среды клеткам давали возможность инкубироваться с ДНК [(SEQ ID No. 4) и линейаризованным вирусным остовом BestBac 2,0] при 27°C в течение 5-7 дней для получения вирусного маточного раствора P0. Для получения вирусного маточного раствора P1 добавляли по 0,5 мл вирусного супернатанта P0 к 50 мл незараженных клеток Sf21 (посев которых с плотностью 5×10^5 клеток/мл производили за день до заражения, чтобы обеспечить однократное удвоение) в среде SF-900II SFM, содержащей 5 мкг/мл гентамицина (Invitrogen, № 15710072). Затем инфицированные клетки инкубировали при 27°C в течение 3 дней при встряхивании со скоростью 110 об/мин (ATR Biotech Multitron Infors HT #AJ118). На 3-й день культуры P1 подсчитывали с помощью ViCell XR (Beckman Coulter Life Sciences, № 383556) для подтверждения того, что произошло инфицирование (размер клеток на >3 мкм больше, чем у неинфицированных клеток, и жизнеспособность приблизительно 85-95%). Культуры собирали в 50 мл конические пробирки и центрифугировали при $2000 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. Вирусные супернатанты P1 переливали в чистые 50 мл центрифужные пробирки, а оставшийся клеточный осадок P1 использовали для получения клеток насекомых, инфицированных бакуловиром (ВПС). Готовили среды для криоконсервации, содержащие среду Sf-900II SFM с 10% инактивированным нагреванием FBS, 10% ДМСО (Sigma, № D2650) и 5 мкг/мл гентамицина, и стерилизовали через 0,22 мкм фильтр непосредственно перед использованием. Клеточный осадок P1 ресуспендировали до плотности 2×10^7 клеток/мл и аликвотировали в криопробирки (1 мл на пробирку). Криопробирки помещали в морозильные камеры Mr. Frosty™ O/N при -80°C и переносили в жидкий азот для длительного хранения на следующий день. Для получения вирусного маточного раствора P2 добавляли по 0,5 мл вирусного супернатанта P1 к 50 мл незараженных клеток Sf21 (посев которых с плотностью 5×10^5 клеток/мл осуществляли за день до заражения, чтобы обеспечить однократное удвоение) в среде SF-900II SFM, содержащей 5 мкг/мл гентамицина. Эти клетки инкубировали при 27°C в течение 3 дней при встряхивании со скоростью 110 об/мин перед сбором маточного материала P2 путем центрифугирования при $2000 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. Вирусные супернатанты P2 выливали и отбрасывали, тогда как клеточный осадок P2 использовали для получения P2 ВПС согласно той же методике, описанной выше. Методику получения бакуловируса валидировали для устойчивого получения P1/P2 ВПС с титрами 2×10^9 БОЕ/мл (2×10^7 клеток/мл $\times 100$ БОЕ/клетка).

Экспрессия полноразмерного STING (WT).

Для создания мембран STING в течение ночи амплифицировали ВПС P1/P2 путем добавления замороженных ВПС к клеткам Sf21, высеянным с плотностью $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Этот объем ВПС, используемый для заражения культуры, рассчитывали, исходя из предполагаемого титра ВПС 2×10^9 БОЕ/мл для достижения MOI=10 при амплификации в течение ночи. После культивирования в течение ночи клетки подсчитывали на ViCell XR для подтверждения того, что инфицирование произошло (размер клетки на ≥ 3 мкм больше, чем у неинфицированных клеток, и жизнеспособность приблизительно 80-90%). Объем инфицированных клеток Sf21 после амплификации в течение ночи, используемый для заражения больших количеств экспрессирующих *Trichoplusia ni* (T.ni; Expression Systems, кат. № 94-002F, www.expressionsystems.com), высевали с плотностью $1,0 \times 10^6$ в клеточных средах (ESF921 SFM, содержащих 5 мкг/мл гентамицина) при MOI=2,0, рассчитанной, исходя из (100 БОЕ/инфицированные клетки Sf21). Клетки оставляли для экспрессии на 48 ч при 27°C перед сбором клеточного осадка центрифугированием при $3400 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. T. ni клетки подсчитывали на ViCell XR для подтверждения того, что инфицирование произошло (размер клеток на ≥ 3 мкм больше, чем у неинфицированных клеток, и жизнеспособность приблизительно 80-90%), перед сбором.

Получение мембраны с полноразмерным STING (WT).

Маточные буферные реагенты:

- 1) 1 М HEPES pH 7,5, Teknova, кат. № H1035;
- 2) 5 М NaCl, Sigma Aldrich, кат. № S5150-1L;

3) KCl, Sirma Aldrich, кат. № 319309-500ML;

4) таблетки, содержащие полный набор ингибиторов протеаз без EDTA, Roche Diagnostics, кат. № 11873580001;

5) бензоназа, Universal Nuclease, Pierce, кат. № 88702.

Лизирующий буфер [25 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl (бензоназа 1:5000, таблетка с полным набором ингибиторов протеаз/50 мл)] добавляли к осадку клеток, экспрессирующих полноразмерный STING (WT), полученный выше, в количестве 5 мл лизирующего буфера на 1 г клеточного осадка. Осадок ресуспендировали и гомогенизировали 20 раз с помощью гомогенизатора Wheaton Dounce для разрушения клеточной мембраны. Затем гомогенизированный лизат пропускали через микрофлюидизатор Emulsiflex-C5 под давлением, близким к 5000 фунт/кв. дюйм (34,5 МПа). Ресуспендированный клеточный осадок центрифугировали при 36000 об/мин (100000×g) в высокоскоростной центрифуге с ротором 45Ti в течение 45 мин при 4°C. Супернатант удаляли. Затем осадок ресуспендировали в промывочном буфере [(25 mM HEPES pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 1 M NaCl (таблетка с полным набором ингибиторов протеаз/50 мл)] в объеме 50 мл клеточного осадка/центрифужная пробирка. Затем смесь клеточный осадок/промывочный буфер гомогенизировали, используя стеклянный гомогенизатор на льду (20 циклов) с последующим центрифугированием при 36000 об/мин в течение 45 мин при 4°C. Супернатант удаляли. Стадию промывки повторяли еще раз. Полученную мембрану ресуспендировали в 20 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% глицерина, ингибиторов протеазы без ЭДТА (1 таблетка/50 мл). Концентрацию белка измеряли с помощью анализа по Брэдфорду (Bio-Rad Protein Assay, кат. № 500-0006), и обогащение белком определяли методом SDS-PAGE и подтверждали вестерн-блоттингом. Ресуспендированные мембраны хранили при -80°C.

Аминокислотная последовательность полноразмерного STING WT [STING (1-379) H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8]:

```
MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAAVLVLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQGLLL
LNGVCSLAEELRHHSRYRGSYWRVTRACLGCPLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLAL
LGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYIIGYLRLLPELQARIRTYNQHYN
NLLRGAVSQRLYILLPLDCGVFDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLENG
QRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDIILADAPESQNNCRLIAYQ
EPADDSFSLSQEVLRLRHLRQEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPPELLISGMKPLPLRTDFS
GGGLNDIFEAQKIEWHEGSLEVLFGPHNNHHHHHH
```

(SEQ. ID. No. 3)

Плазмидная последовательность для полноразмерного WT STING [STING (1-379) H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8/pBAC1]:

```
GGAACGGCTCGCCCACTATTAATGAAATAAAAATCCAATTTAAAAAACGCAGCAA
GAGAAACATTTGTATGAAAGAATGCGTAGAAGGAAGAAAAATGTCGTCGACATGCTGAACAAC
AAGATTAATATGCGCTCCGTGTATAAAAAAATATGAAACGATTTGAAAGAAAAAATGTACCCGC
GCGCGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACTAACTGTTACATTCGCAACGCGGTTTCGTGTGC
CAAGTGTGAAAACCGATGTTAATCAAGGCTCTGACGCATTTCTACAACCACGACTCCAAGTGT
GTGGGTGAAGTCATGCATCTTTAAATCAAAATCCCAAGATGTGTATAAACCCAAACTGCCAAA
AAATGAAAATGTCGACAAGCTCTGTCGTTGCTGGCAACTGCAAGGGTCTCAATCCTATTTG
TAATTAATGAAATAAAAAAATATAAATGTCAAATTTGTTTTTATTAACGATACAAACCAA
ACGCAACAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAATGAAAACGCGTAGTTAATCGCTGAGGTA
ATATTAATAATCATTTTCAAATGATTCACAGTTAATTTGCGACAATAAATTTATTTTCACAT
AACTAGACGCTTGTGCTCTCTTCTGATTCCTTCTTTTTTCATTTTTCTCTCATAAA
AATTAACATAGTTATATCGTATCCATATATGTATCTATCGTATAGAGTAAATTTTTGTTGTC
ATAAATATATATGTCTTTTTAAATGGGGTGTATAGTACCGCTGCGCATAGTTTTCTGTAATTT
ACAACAGTGCATTTTTCTGGTAGTCTTCGGAGTGTGTGCTTTAATTAATAATTTATATAAT
CAATGAATTTGGGATCGTCGGTTTTGTACAATATGTTGCCGGCATAGTACGAGCTTCTCTAG
TTCAATTACACCATTTTTTAGCAGCACCGGATTAACATAACTTTCCAAAATGTTGTACGAACCG
TTAAACAAAAACAGTTCACCTCCCTTTTCTATACTATTTGCTGCGAGCAGTTGTTGTGTAA
AAATAACAGCCATTGTAATGAGACGCACAAAATAATATACAAAATGGAAATGTCTATCAATAT
ATAGTTGCTGATCAGATCGATCATGGAGATAATAAAAATGATAACCATCTCGCAATAAATAA
GTATTTTACTGTTTTCTGTAACAGTTTTGTAATAAAAAACCTATAAATATAGGATCCATGCCCC
ACTCCAGCCTGCATCCATCCATCCCGTGTCCCAGGGGTACGGGGCCAGAGGCAGCCTTGGT
TCTGCTGAGTGCCTGCCTGGTGACCCCTTTGGGGCTAGGAGAGCCACCAGAGCACACTCTCCGG
TACCTGGTGTCCACCTAGCCTCCCTGCAGCTGGGACTGCTGTAAACGGGGCTGCGAGCCTGG
CTGAGGAGTGCGCCACATCCACTCCAGTACCGGGCAGCTACTGGAGGACTGTGCGGGCCTG
CCTGGGTGCCCCCTCCGCGTGGGGCCCTGTTGCTGCTGTCATCTATTTCTACTACTCCCTC
CCAAATGCGGTGCGGCCCGCCCTTCACTTGGATGCTTGCCTTCCGGGCTCTCGAGGCATGA
ACATCTCTGGGCTCAAGGGCTGGCCCCAGCTGAGATCTGCGAGTGTGAAAAAGGGAA
TTTCAACGTGGCCATGGGCTGGCATGGTCATATACATCGGATATCTGCGGCTGATCCTGCCA
GAGCTCCAGGCCCGGATTCGAACTTACAATCAGCATTACAACAACCTGCTACGGGGTGCAGTGA
GCCAGCGGCTGTATATTTCTCCCATTTGGACTGTGGGGTGCCTGATAACCTGAGTATGGCTGA
CCCCAATTCGCTTCTGGATAAATGCCCCAGCAGACCGGTGACCGTGTGGCATCAAGGAT
CGGGTTTACAGCAACAGCATCTATGAGCTTCTGGAGAAGGGGACGGGGCCGACCTGTGTCC
TGGAGTACGCCACCCCTTGAGACTTTGTTGCCATGTCAATAACAGTCAAGCTGGCTTAG
CCGGGAGGATAGGCTTGTAGCAGGCCAACTCTTCTGCCGACACTTGGAGACATCTGGCAGAT
```

GCCCTGAGTCTCAGAACACTGCCGCTCATTGCCTACCAGAACCTGCAGATGACAGCAGCT
TCTCGCTGTCCCAGGAGGTTCTCCGGCACCTGCCGAGGAGGAAAAGGAAAGAGGTTACTGTGGG
CAGCTTGAAGACCTCAGCGGTGCCAGTACCTCCACGATGTCCCAAGAGCCTGAGCTCCTCATC
AGTGGAAATGAAAAGCCCTCCCTCFCGACGAGATTCTCTGGCGTGGCCTGAACGACATCT
TCGAAGCCAGAAAAATCGAATGGCATGAAGGACGCTGGAAGTGTGTTCCAGGGCCACACCA
CCATCATCACCATCACCATTAATGAGCGGCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTAACCT
AGGTAGCTGAGCGCATGCAAGCTGATCCGGGTTATTAGTACATTTATAAGCGCTAGATTCTGT
GCGTTGTGATTTACAGACAATTGTTGTACGTATTTAATAATTCATTAATTTATAATCTTTA
GGTGGTATGTAGAGCGAAAAATCAAATGATTTTCAGCGTCTTTATATCTGAATTTAAATATTA
AATCCTCAATAGATTTGTAATAATAGGTTTCGATTAGTTTCAAACAAGGGTTGTTTTCCGAACC
GATGGCTGGACTATCTAATGGATTTTCGCTCAACGCCAAAACTTCCAAATCTGTAGCAGC
AATCTAGCTTTGTCGATATTCGTTTGTGTTTTGTTTTGTAATAAAGGTTCCAGCTGTTCAAAA
TATTATGCGCTTTTGTATTCTTTCATCACTGTCGTTAGTGTACAATTGACTCGACGTAAACAC
GTTAAATAGAGCTTGGACATATTAACATCGGGCTGTAGCTTTATTAGGCCGATTATCGTCCG
TCGTCACACCTCGTCCGTTAGAAGTGTCTCCGAGAGCAGATTTGCCATAGCCACACGAGCC
TATTAATGTGTCGGCTAACACGTCGCGATCAAATTTGTAGTTGAGCTTTTTGGAATTTTC
TGATTGCGGGCGTTTTTGGCGGGTTTTCAATCTAATGTGCCGATTTTAAATTCAGACAACAG
TTAGAAAGCAGATGTTGTCAGGCGGTGTAACATTCAGACGGCAATCTACTAATGGCGCGGTG
GTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGCGCAGCGGGCTGGCGCGGAGCGCGGAG
CGGAGGTGGTGGCGGTGATGACAGCGGCTTAGGCTCAAATGTCTCTTTAGGCAACACAGTC
GGCACCTCAACTATTGTACTGGTTTCGGCGCGCTTTTGGTTTGACCGGTCTGAGACGAGTGC
GATTTTTTCGTTTCTAATAGCTTCCAACAATTGTTGTCTGTCTTAAAGGTGCAGCGGTTG
AGGTTCCGTCGGCATTGGTGGAGCGGGCGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGTGGGA
GGCGCTGGAATGTTAGGCACGGGAGAAGGTGGTGGCGCGGTGCCCGCGTATAATTTGTTCTG
GTTAGTTTTGTTCCGCGCAGATTGTGGGACCGCGCGAGCGCGCTGGCTGCACACCGGAAGG
TCGCTGCTTCGAGGCAGCGCTTGGGGTGGTGGCAATCAATATTATAATTGGAATACAAATCG
TAAAAATCTGCTATAAGCATGTAAATTCGCTATCGTTTACCGTGGCGATATTTAAACAACCGCT
CAATGTAAGCAATTGATTGTAAGAGATTGTCTCAAGCTCGGATCGATCCCGCAGCGCGATAA
CAAGCCTTTTCATTTTTACTACAGCATTGTAGTGGCGAGACACTTCGCTGTCGTCGAGGTTAA
ACGCTTCTCGTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGGCTTCCGGTGGCGGAGCGGTATCAGCTCA
CTCAAAGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCA
AAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC
GCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATACAGGCGTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCTTCCCG
CTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCT
GTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCGGT
TCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAAGACAGC
TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGC
TCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACACC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG
AAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGAT
TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTAATAAAGTATTT
AAATCAATCTAAAGTATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGG
CACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCCATAGTTGCTGACTCCCGTCTGTAGAT
AACTACGATACGGGAGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGC
TCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGCGGAGCGCAGAAAGTGGT
CTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTC
GCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCCG
TTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGT
TGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGT
GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGC
TTTTCTGTGACTGGTGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCAT
CATTTGAAAAAGCTTCTTCGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTG
ATGTAACCCACTCGTGCACCACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACACAGCGTTCTGGGT
GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAAT
ACTCATACTCTCCTTTTCAATATATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAG
TGCCACCTGACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGTTTCTCCCTTCTTTCGCGC
ACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTG
CTTTACGGCACTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTATGTTACAGTGTAGTGGGCCATCGCC
CTGATAGACGGTTTTTCGCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTTTGTTTC
CAAATGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGA
TTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAAATTAACCGCAATTTAAACAAAA
ATTAACGTTTACAATTTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGCGCATCGGTG
CGGCCTCTTCGCTATTACGCCA

(SEQ. ID. No. 4)

Конкретные соединения по изобретению оценивали в анализе *in vitro* связывания WT STING, как описано выше. В следующей ниже таблице приведены биологические данные для этих соединений в виде значений EC₅₀.

Таблица 7
Фильтрационное связывание ³H-сGAMP для WT STING

Соединение	EC ₅₀ (нМ)	Соединение	EC ₅₀ (нМ)	Соединение	EC ₅₀ (нМ)
Пример 1	5172	Пример 18	21% Inh @ 20 мкМ	Пример 32	17030
Пример 2	11210	Пример 19	30% Inh @ 20 мкМ	Пример 33	30% Inh @ 20 мкМ
Пример 3	41% Inh @ 20 мкМ	Пример 20	33% Inh @ 20 мкМ	Пример 34	18% Inh @ 20 мкМ
Пример 4	1145	Пример 21	14290	Пример 35	7671
Пример 7	20% Inh @ 20 мкМ	Пример 22	17100	Пример 36	9% Inh @ 20 мкМ
Пример 8	15520	Пример 23	37% Inh @ 20 мкМ	Пример 41	14690
Пример 9	10890	Пример 24	8540	Пример 43	4108
Пример 10	31% Inh @ 20 мкМ	Пример 25	8644	Пример 46	24% Inh @ 20 мкМ
Пример 11	3873	Пример 26	2081	Пример 48	23% Inh @ 20 мкМ
Пример 13	2081	Пример 27	19% Inh @ 20 мкМ	Пример 50	2144
Пример 14	8644	Пример 28	9259	Пример 51	3% Inh @ 20 мкМ
Пример 15	894	Пример 29	16% Inh @ 20 мкМ	Пример 52	101% Inh @ 20 мкМ
Пример 16	2480	Пример 30	18670	Пример 53	7% Inh @ 20 мкМ
Пример 17	14750	Пример 31	10% Inh @ 20 мкМ		

Пример 57. Секретция IFN-β в культуре клеток THP1 (5 ч).

Способность соединений стимулировать секрецию интерферона-бета в клетках THP1 измеряли с помощью набора IFN-β AlphaLISA человека (Perkin Elmer, кат. № AL265F). Базовая методика выглядит следующим образом:

Акустический диспенсер Labcyte Echo 550 использовали для переноса 120 нл соединения, растворенного в ДМСО, в лунки пустого стерильного 384-луночного микропланшета (Corning, кат. № 3712). Клетки THP1 (American Type Culture Collection, кат. № TIB202), предварительно замороженные в восстановительной среде (Life Technologies, № 12648-010), оттаивали и сразу разбавляли в 10 раз в аналитической среде при 37°C (RPMI 1640+L-глутамин & фенол-красный, Life Technologies, кат. № 11875-085, 0,5% инактивированная нагреванием фетальная бычья сыворотка, Sigma Aldrich, кат. № F4135; 1 mM пируват натрия, Life Technologies, кат. № 11360-070; 1× неосновных аминокислот, Life Technologies, кат. № 11140-050). Жизнеспособность и количество клеток определяли с помощью счетчика клеток Beckman Coulter V-Cell XR. Суспензию клеток центрифугировали при 200×g в течение 5 мин при КТ. Клетки ресуспендировали до плотности 0,8×10⁶/мл в аналитической среде при 37°C. Затем жидкости переносили с помощью электронной многоканальной пипетки Matrix или автоматизированной платформы для обработки жидкостей Agilent Bravo.

Анализ начинали путем распределения 40 мкл предварительно приготовленной клеточной суспензии в содержащие соединения лунки планшета. Через 5 ч инкубации при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ планшет с клетками и соединениями центрифугировали при 200×g в течение 5 мин при КТ. Из каждой лунки по 5 мкл супернатанта переносили в соответствующие лунки белого 384-луночного планшета (Perkin Elmer, кат. № 6005620). К этим содержащим супернатант лункам добавляли 10 мкл 5× гранул акцептора антианалита (50 мкг/мл AlphaLISA HiBlock Buffer) и инкубировали в течение 30 мин при КТ при встряхивании на орбитальном настольном шейкере. В каждую лунку добавляли по 10 мкл 5× антианалита для биотинилированного антителя (5 нМ в буфере AlphaLISA HiBlock) и инкубировали на орбитальном настольном шейкере в течение 60 мин при КТ или в течение ночи при 4°C. В каждую лунку добавляли по 25 мкл 2× микросфер SA-Donor (80 мкг/мл в буфере AlphaLISA HiBlock) и инкубировали в течение 30-45 мин при КТ в темноте при встряхивании на орбитальном настольном шейкере. Затем

планшет считывали на Perkin Elmer Envision ($\lambda_{ex}=680$ нм, $\lambda_{et}=570$ нм). Выраженный в процентах эффект сигнала AlphaLISA для каждой концентрации соединения рассчитывали, исходя из 30 мкМ сGAMP положительных контролей и 0,3% ДМСО отрицательных контролей. График зависимости выраженного в процентах эффекта от \log концентрации соединений аппроксимировали с помощью 4-параметрического уравнения "доза-ответ" для вычисления значений EC_{50} . Тестируемые соединения оценивали для концентраций 30000, 10000, 3333, 1111, 370,4, 123,4, 41,2, 13,7, 4,6 и 1,5 нМ с 0,3%-ным остаточным ДМСО. Контрольное соединение, сGAMP, оценивали для концентраций 100000, 33333, 11111, 3704, 1235, 412, 137, 46 и 15 нМ с 0,3%-ным остаточным ДМСО.

Соединения по настоящему изобретению оценивали в отношении секреции IFN- β в культуре клеток THP1, как описано выше. В приведенной ниже таблице представлены биологические данные для этих соединений в виде процента активации относительно 2'3'-сGAMP с концентрацией 30 мкМ.

Таблица 8

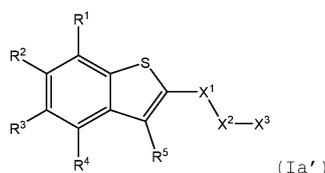
Секреция IFN- β в культуре клеток THP1 (5 ч)

Соединение	% эффекта при 30 мкМ относительно 2'3'-сGAMP	Соединение	% эффекта при 30 мкМ относительно 2'3'-сGAMP	Соединение	% эффекта при 30 мкМ относительно 2'3'-сGAMP
Пример 1	144	Пример 19	153	Пример 37	42
Пример 2	149	Пример 20	47	Пример 38	154
Пример 3	59	Пример 21	162	Пример 39	193
Пример 4	34	Пример 22	43	Пример 40	93
Пример 5	77	Пример 23	191	Пример 41	312
Пример 6	130	Пример 24	214	Пример 42	6
Пример 7	290	Пример 25	394	Пример 43	56
Пример 8	260	Пример 26	228	Пример 44	20
Пример 9	298	Пример 27	14	Пример 45	104
Пример 10	182	Пример 28	86	Пример 46	205
Пример 11	132	Пример 29	9	Пример 47	90
Пример 12	16	Пример 30	15	Пример 48	71
Пример 13	228	Пример 31	24	Пример 49	111
Пример 14	394	Пример 32	24	Пример 50	115
Пример 15	115	Пример 33	25	Пример 51	31
Пример 16	129	Пример 34	34	Пример 52	142
Пример	21	Пример	57	Пример	182
17		35		53	
Пример 18	273	Пример 36	11	Пример 54	66

Следует иметь в виду, что различные описанные выше и другие признаки и функции, или их альтернативы, могут быть при желании объединены во множестве других систем или применений. Также следует иметь в виду, что различные непредвиденные в настоящее время или непредусмотренные альтернативы, модификации, изменения или улучшения в них впоследствии могут быть сделаны специалистами и также должны охватываться приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (Ia')



или его фармацевтически приемлемая соль, где

R^1 выбран из группы, состоящей из H, F, C_1 - C_3 алкила и C_1 - C_3 галогеналкила;

R^2 выбран из группы, состоящей из галогена, C_1 - C_3 алкила, C_1 - C_3 галогеналкила, OC_1 - C_3 алкила, OC_1 - C_3 галогеналкила, OH, C_2 - C_3 алкенила, C_2 - C_3 алкинила, $N(C_1$ - C_3 алкила) $_2$, $NH(C_1$ - C_3 алкила) и SC_1 - C_3 алкила;

R^3 выбран из группы, состоящей из галогена, C_1 - C_3 алкила, C_1 - C_3 галогеналкила, OC_1 - C_3 алкила, OC_1 - C_3 галогеналкила, OH, C_2 - C_3 алкенила, C_2 - C_3 алкинила, $N(C_1$ - C_3 алкила) $_2$, $NH(C_1$ - C_3 алкила) и SC_1 - C_3 алкила;

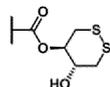
R^4 выбран из группы, состоящей из H, F, C_1 - C_4 алкила и C_1 - C_3 галогеналкила;

R^5 выбран из группы, состоящей из H, F, Cl, OR^6 , C_1 - C_3 алкила и C_1 - C_3 галогеналкила;

каждый R^6 независимо выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_4 алкила и C_1 - C_4 галогеналкила;

X^1 представляет собой C(O);

X^2 представляет собой CHR^8CHR^8 ;



X^3 выбран из группы, состоящей из $COOR^6$, SO_2R^6 и $C(O)N(R^9)_2$, где каждый R^9 независимо выбран из группы, состоящей из H, $COOR^6$ и SO_2R^6 ; и

каждый R^8 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_4 алкила, C_1 - C_4 алкила, замещенного OH, C_1 - C_4 алкила, замещенного OC_1 - C_3 алкилом, и C_3 - C_6 циклоалкила, и где необязательно 2 R^8 взяты вместе, наряду с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-членного конденсированного кольца; и

где, в случае когда X^1 - X^2 - X^3 представляет собой X^1 - CHR^8CH_2 - X^3 , по меньшей мере один из R^2 и R^3 не выбран из группы, состоящей из галогена, C_1 - C_3 алкила и C_1 - C_3 галогеналкила.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где

R^1 выбран из группы, состоящей из H и F;

R^2 выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 и $NHCH_3$;

R^3 выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 и $NHCH_3$;

R^4 выбран из группы, состоящей из H и F;

R^5 выбран из группы, состоящей из H и Cl;

X^1 представляет собой C(O);

X^2 представляет собой CHR^8CHR^8 ;



X^3 выбран из группы, состоящей из $COOH$, $COOC(CH_3)_3$ и HO ; и

каждый R^8 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_4 алкила.

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где

R^1 выбран из группы, состоящей из H и F;

R^2 выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 и $NHCH_3$;

R^3 выбран из группы, состоящей из Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 и $NHCH_3$;

R^4 выбран из группы, состоящей из H и F;

R^5 выбран из группы, состоящей из H и Cl;

X^1 представляет собой C(O);

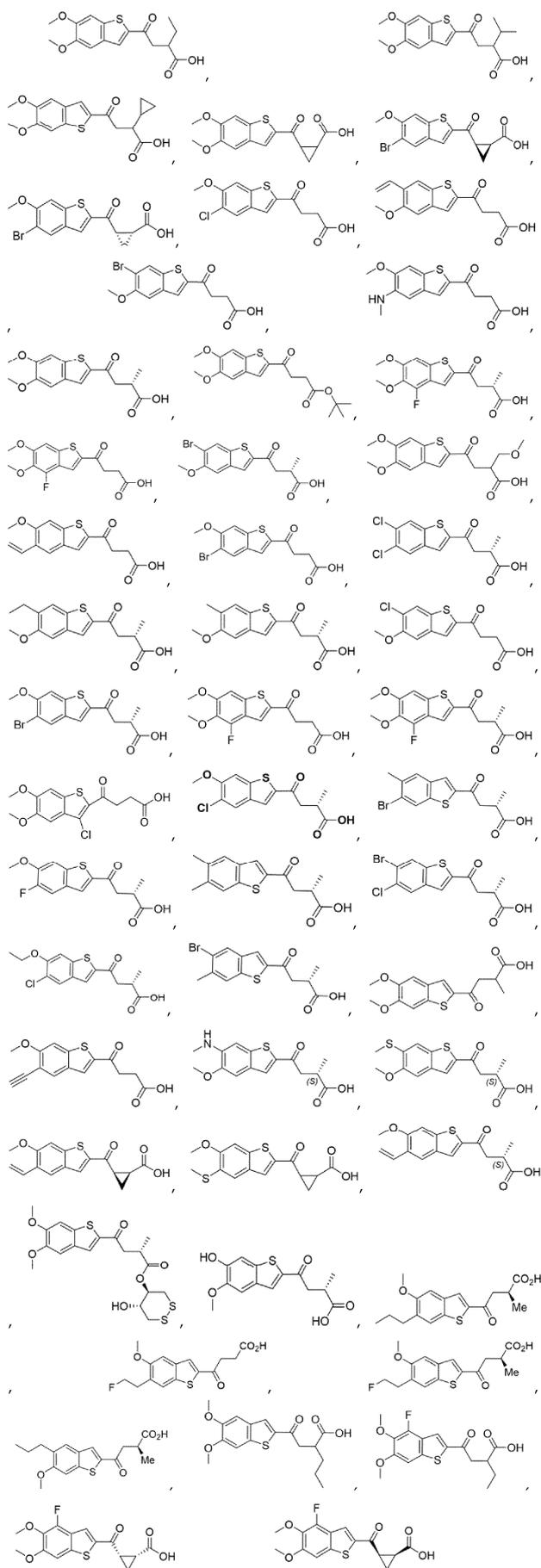
X^2 представляет собой CHR^8CHR^8 ;

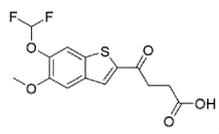


X^3 выбран из группы, состоящей из $COOH$, $COOC(CH_3)_3$ и HO ; и

$2R^8$ взяты вместе, наряду с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-членного конденсированного кольца.

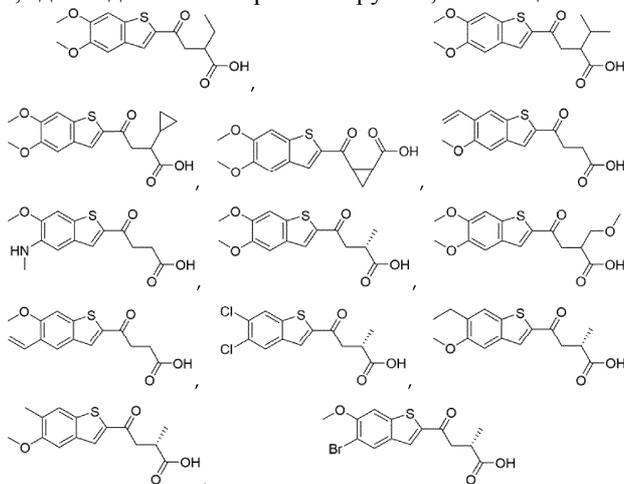
4. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из группы, состоящей из



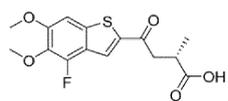


или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по п.4, где соединение выбрано из группы, состоящей из

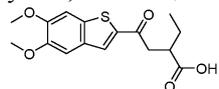


и



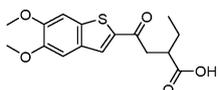
или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Соединение по п.4, выбранное из группы, состоящей из

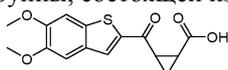


и его фармацевтически приемлемых солей.

7. Соединение по п.6, представляющее собой

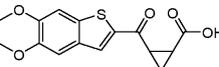


8. Соединение по п.4, выбранное из группы, состоящей из

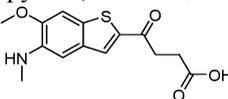


и его фармацевтически приемлемых солей.

9. Соединение по п.8, представляющее собой

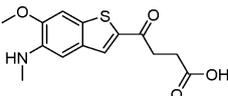


10. Соединение по п.4, выбранное из группы, состоящей из

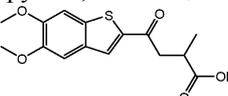


и его фармацевтически приемлемых солей.

11. Соединение по п.10, представляющее собой

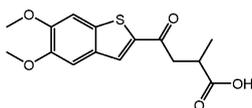


12. Соединение по п.4, выбранное из группы, состоящей из

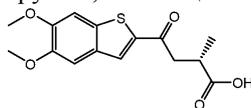


и его фармацевтически приемлемых солей.

13. Соединение по п.12, представляющее собой

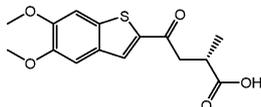


14. Соединение по п.4, выбранное из группы, состоящей из

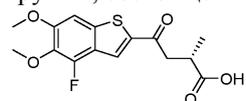


и его фармацевтически приемлемых солей.

15. Соединение по п.14, представляющее собой

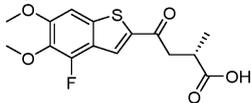


16. Соединение по п.4, выбранное из группы, состоящей из



и его фармацевтически приемлемых солей.

17. Соединение по п.16, представляющее собой



18. Применение соединения по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемой соли в терапии.

19. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Применение соединения по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения нарушения клеточной пролиферации у субъекта.

21. Применение по п.20, где нарушение клеточной пролиферации представляет собой рак.

22. Применение фармацевтической композиции по п.19 для лечения нарушения клеточной пролиферации у субъекта.

23. Применение по п.22, где нарушение клеточной пролиферации представляет собой рак.

