

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038773**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.18

(21) Номер заявки
201892020

(22) Дата подачи заявки
2017.03.08

(51) Int. Cl. *C07D 403/12* (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 471/10 (2006.01)
C07D 209/34 (2006.01)
C07D 295/145 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C07C 205/57 (2006.01)

(54) ИНДОЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗЫ

(31) 16159231.6

(32) 2016.03.08

(33) EP

(43) 2019.02.28

(86) PCT/GB2017/050619

(87) WO 2017/153748 2017.09.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕСПИВЕРТ ЛИМИТЕД (GB)

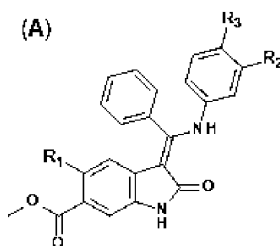
(72) Изобретатель:
**Уолтерс Иэн, Бёрч Луиз, Коллингвуд
Стефен Пол, Стивенсон Кристофер
Скотт (GB)**

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

(56) WO-A1-02081445

ROTH GERALD J. ET AL.: "Design, Synthesis, and Evaluation of Indolinones as Triple Angiokinase Inhibitors and the Discovery of a Highly Specific 6-Methoxycarbonyl-Substituted Indolinone (BIBF 1120)", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 52, no. 14, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 4466-4480, XP002582395, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM900431G [retrieved on 2009-06-12], page 4468; table 2; compounds 54, 60, abstract WO-A1-2006067168

(57) Изобретение относится к соединениям формулы (A)



к композициям, содержащим их, способу получения соединений и к применению соединений для лечения, например при лечении фиброзных заболеваний или интерстициальных заболеваний легких, в частности идиопатического легочного фиброза.

038773 B1

038773 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится *inter alia* к новым соединениям, которые ингибируют протеинкиназы, и к их применению в терапии, в частности для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных легочных заболеваний, особенно идиопатического легочного фиброза и респираторных заболеваний. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединения.

Предшествующий уровень техники изобретения

Интерстициальные легочные заболевания (ILD) характеризуются рубцеванием легкого, что приводит к легочной дисфункции, которая, в конечном итоге, вызывает респираторную недостаточность. Существует множество ILD с неизвестной причиной, которые называют идиопатическими. Идиопатический легочный фиброз (IPF) является наиболее распространенным типом ILD. IPF поражает около 170000 человек в Европе и 130000 человек в Соединенных Штатах Америки, при этом каждый год только в США диагностируют приблизительно 48000 новых случаев, и ежегодно в США умирают 40000 человек. Показатели смертности от IPF очень высоки с медианой выживаемости 3-5 лет от постановки диагноза и с зарегистрированной 5-летней выживаемостью менее 30%, что на уровне показателей наиболее летальных злокачественных опухолей. Как показали до настоящего времени, немногие варианты лечения, отличные от трансплантации легкого, являлись эффективными, и лечение для большинства пациентов представляло собой контроль симптомов и паллиативную помощь.

IPF является хроническим и фатальным заболеванием, главным образом характеризуемым прогрессирующим снижением легочной функции, вызванным рубцеванием легочной ткани, что приводит к усугублению одышки. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) являются известными мощными митогенами для фибробластных клеток, которые впоследствии замещают нормальную ткань в легких при возникновении фиброза.

Доказательство патогенной роли PDGF, VEGF и FGF в ILD продемонстрировали клинически. Первичным участком поражения является интерстиций, ткань между альвеолярными мешками в легком, но также поражаются легочные ткани, периферические дыхательные пути и сосуды. Считают, что процесс заболевания инициируется рядом микроповреждений альвеолярного эпителия в легком. После повреждения повышенная сосудистая проницаемость приводит к образованию сгустка, и резидентные эпителиальные клетки пролиферируют, пытаются заменить те клетки, которые погибли в результате повреждения. Этот процесс инициирует высвобождение различных факторов роста (например, PDGF, VEGF, FGF и трансформирующего фактора роста β (TGF β)), что приводит к aberrантной активации эпителиальных клеток, аномальному сосудистому ремоделированию и, что особенно важно, пролиферации и миграции фибробластов в легкое. Факторы роста также индуцируют трансформацию резидентных клеток в миофибробласты, которые вместе с фибробластами организуются в очаги (King T.E. Jr. et al., *Lancet*, 2011, 3; 378(9807): 1949-61; Selman M. et al., *Ann. Intern. Med.*, 2001, 16; 134(2): 136-51). Такие клеточные изменения приводят к нарушению базальной мембраны и к чрезмерному накоплению белков внеклеточного матрикса в интерстициальном пространстве. Результатом является возможное разрушение нормальной архитектуры альвеолярно-капиллярной единицы и рубцевание легкого. Патологии, которые определяют обычный интерстициальный паттерн (UIP) фиброза, характерный для IPF, представляя собой гетерогенный паттерн чередующихся участков нормального легкого, интерстициального воспаления, плотного фиброза, фибробластических очагов и сотовых структур, особенно в субплевральной области легкого (Du Bois R.M., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, 9(2): 129-40; Selman M. et al., *Ann. Intern. Med.*, 2001, 16; 134(2):136-51; King T.E. Jr. et al., *Lancet*, 2011, 3; 378(9807): 1949-61). Потеря нормальной архитектуры и рубцевание интерстициального пространства приводит к значительному снижению способности к газообмену, что вызывает развитие классических симптомов заболевания, а именно одышки, хронического кашля, инспираторных хрипов при аускультации, и к аномальной спирометрии (Castriotta R.J. et al., *Chest*, 2010, 138(3):693-703). В то время как течение заболевания является неоднородным, медиана выживаемости составляет приблизительно 3-5 лет, и наиболее распространенной причиной смерти является респираторная недостаточность из-за прогрессирующих патологий, которые нарушают нормальное функционирование легких и газообмен.

Для достижения лучшей переносимости, а также лучшей эффективности в лечении легочных нарушений может быть целесообразным доставка лекарственного средства непосредственно на участок действия в легкое. Это позволяет достичь более высоких концентраций лекарственного средства на участке действия, что обеспечивает снижение суммарной дозы, а, следовательно, и снижение системных побочных эффектов.

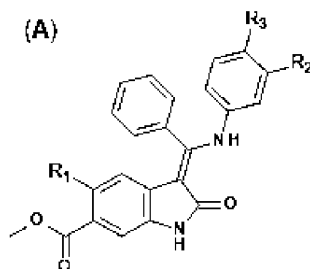
Нинтеданиб, ингибитор протеинкиназы, был одобрен FDA в 2014 году для лечения IPF путем перорального введения. Однако он ассоциируется с существенными системными неблагоприятными событиями, в том числе с абдоминальной болью, рвотой и диареей. В WO 2006/067165 описывают, что ингибиторы VEGFR, FGFR и PDGFR, такие как нинтеданиб, могут быть, как предполагают, применимы в лечении фиброзных заболеваний, таких как IPF. В Fehrenbach H. et al., *Virchows Arch.*, 1999, 435(1):20-31, раскрывается, что VEGFR связывают с причиной легочного фиброза. В Lindroos P., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2001, 280:L354-L362, описывается, что активация рецептора PDGF является механизмом гиперплазии миофибробластов при легочном фиброзе. В WO 01/27081 показали, что соединения,

обладающие ингибирующими эффектами в отношении киназ, в том числе VEGFR, PDGFR и FGFR, являются подходящими для лечения фиброзных заболеваний, и раскрыли ряд замещенных по 6-положению индолинонов. Подобным образом, в WO 2006/067165 и WO 2006/067168 также раскрываются замещенные по 6-положению индолиноны для применения в качестве медицинских препаратов для лечения или предупреждения фиброзных заболеваний.

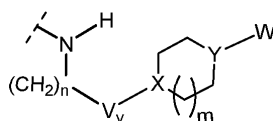
В уровне техники сохраняется потребность в разработке дополнительных соединений, особенно соединений, которые переносятся лучше, чем нинтеданиб, для лечения фиброзных заболеваний и интерстициальных легочных заболеваний, таких как IPF. Желательно, чтобы такие соединения имели низкую дозу, длительную продолжительность действия, подходящую для введения дозы один раз, два раза или три раза в сутки, а также хорошую эффективность и переносимость, особенно при доставке местным путем в легкое. Соединения формулы (I), описываемые в документе, призваны решить эту задачу.

Краткое описание изобретения

Согласно изобретению представлено соединение формулы (A)

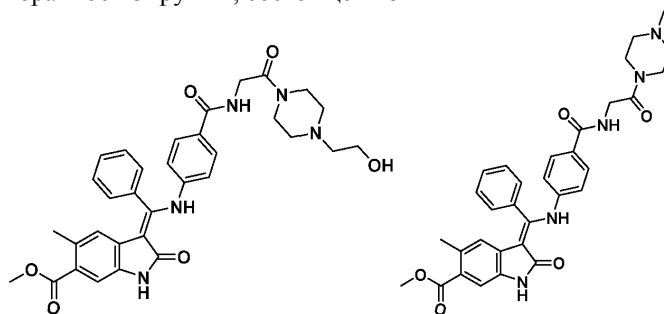


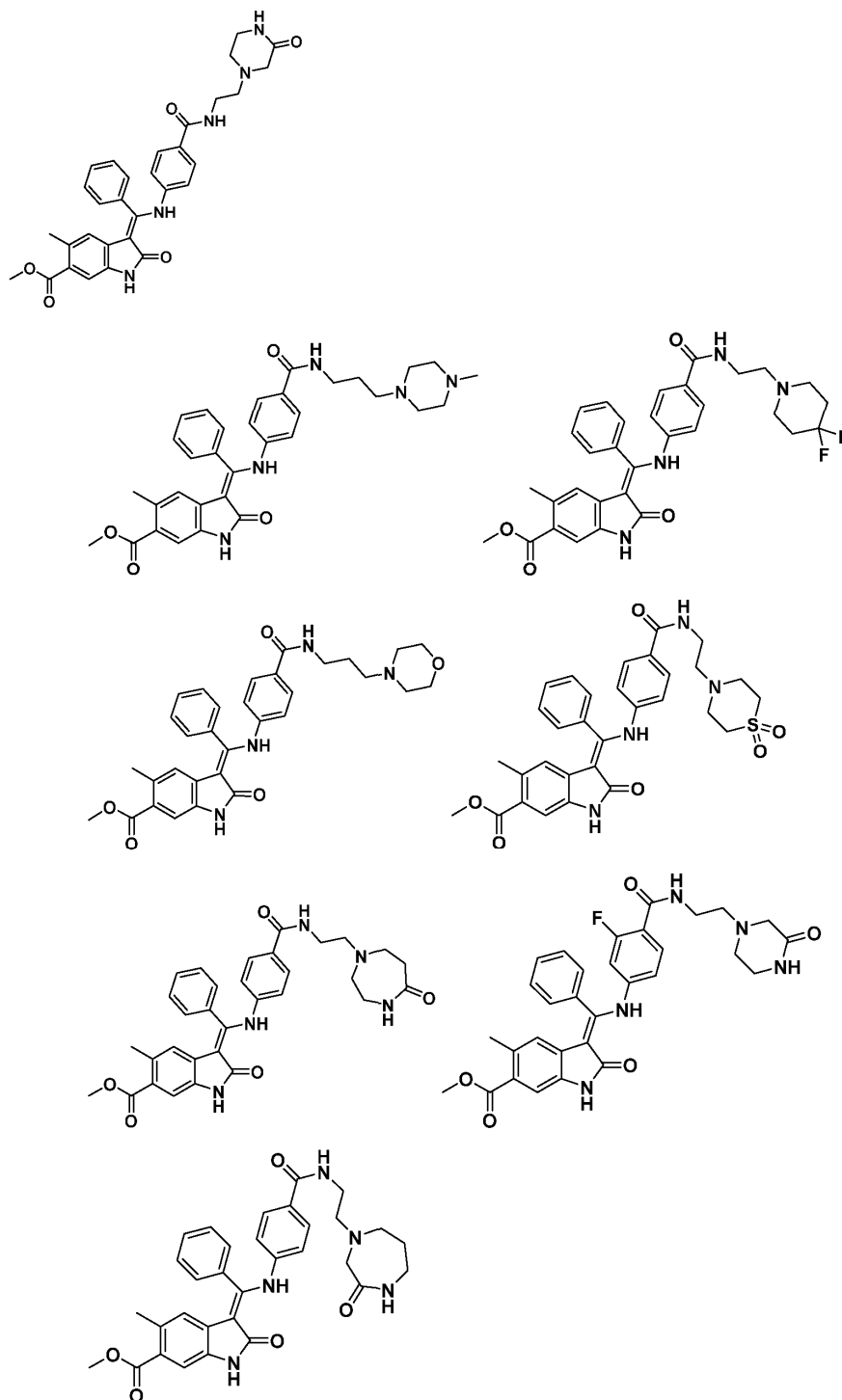
где R_1 представляет собой Me, Et, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ или $\text{C}\equiv\text{C}-\text{Me}$;
 один из R_2 и R_3 представляет собой группу, выбранную из H, $-\text{C}_1-\text{C}_6$ алкила, C_1-C_6 алкокси, $-\text{C}_3-\text{C}_8$ циклоалкила, $-\text{CH}_2-(\text{C}_3-\text{C}_8\text{циклоалкил})$, галогена и циано, а другой представляет собой группу $-\text{Z}-\text{R}_x$;
 Z представляет собой CO или SO_2 ;
 R_x представлен формулой (iv)



где V представляет собой CO;
 где v представляет собой 0 или 1;
 где n представляет собой 0, 1 или 2, при условии, что если v представляет собой 1, n представляет собой 1 или 2;
 m представляет собой 1 или 2;
 X представляет собой CH или N, при условии, что если n представляет собой 0 или 1, X представляет собой CH;
 Y представляет собой CH или N;
 W представляет собой группу, выбранную из $-\text{C}_1-\text{C}_4$ алкила, $-\text{C}_1-\text{C}_4$ гидроксиалкила, C_1-C_4 алкокси(C_1-C_4)алкил-, $-\text{C}_1-\text{C}_4$ алкилен $\text{CONR}_{20}\text{R}_{21}$, $-\text{C}_1-\text{C}_4$ алкилен $\text{NR}_{20}\text{COR}_{21}$, $-\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_4)$ алкил, $-\text{CO}(\text{C}_1-\text{C}_4)$ алкила, галогена, CN, OH и $\text{NR}_{22}\text{R}_{23}$, при условии, что если W представляет собой $\text{NR}_{22}\text{R}_{23}$, $-\text{C}_1$ алкилен $\text{NR}_{20}\text{COR}_{21}$ или галоген, Y представляет собой CH;

R_{20} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} и R_{25} независимо представляют собой H или $-\text{C}_1-\text{C}_4$ алкил;
 или соединение, выбранное из группы, состоящей из





или его фармацевтически приемлемая соль (далее "соединения по настоящему изобретению" или "соединение по настоящему изобретению").

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных заболеваний легких, содержащая соединение по настоящему изобретению в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

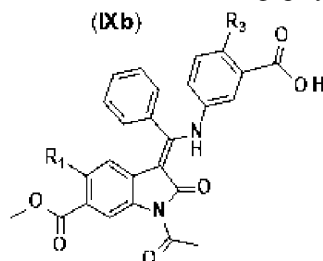
Кроме того, изобретение относится к применению соединения по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных заболеваний легких, выбранных из идиопатического легочного фиброза (IPF), гигантоклеточной интерстициальной пневмонии, саркоидоза, кистозного фиброза, респираторного дистресс-синдрома, индуцированного лекарственным средством легочного фиброза, гранулематоза, силикоза, асбестоза, вызванного вирусом гепатита С цирроза печени; или заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из склеродермии, саркоидоза и системной красной волчанки; или заболеваний, характеризующихся гиперпролиферацией клеток, выбранных из рака, или респираторных нарушений, выбранных из хронической обструктивной болезни лёгких (COPD), хронического бронхита и эмфиземы, астмы, ринита и синусита.

Изобретение также относится к применению соединения по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения фиброзных заболеваний, выбранных из легочного фиброза, ассоциированного с ревматоидным артритом, респираторного дистресс-синдрома, острого повреждения легкого, вызванного облучением легочного фиброза или пневмонита, хронического гиперчувствительного пневмонита, системного склероза, синдрома Шегрена, интерстициальных легочных заболеваний, и легочной артериальной гипертензии (РАН); или с заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из гипертрофированного рубцевания и келоидов; или глазных заболеваний, компонентом которых является фиброз, выбранных из глаукомы, возрастной дегенерации желтого пятна, диабетического отека желтого пятна, заболевания сухости глаз и диабетической ретинопатии; или фиброза в кишечнике, ассоциированного с воспалительным заболеванием кишечника.

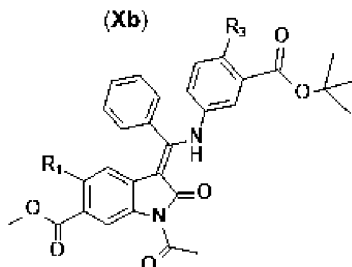
Настоящее изобретение также относится к применению соединения по настоящему изобретению в комбинации с нинтеданибом или пирфенидоном для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных заболеваний легких, выбранных из идиопатического легочного фиброза (IPF), гигантоклеточной интерстициальной пневмонии, саркоидоза, кистозного фиброза, респираторного дистресс-синдрома, индуцированного лекарственным средством легочного фиброза, гранулематоза, силикоза, асбестоза, вызванного вирусом гепатита С цирроза печени; или заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из склеродермии, саркоидоза и системной красной волчанки; или заболеваний, характеризующихся гиперпролиферацией клеток, выбранных из рака; или респираторных нарушений, выбранных из хронической обструктивной болезни лёгких (COPD), хронического бронхита и эмфиземы, астмы, ринита и синусита.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения по настоящему изобретению в комбинации с нинтеданибом или пирфенидоном для лечения фиброзных заболеваний, выбранных из легочного фиброза, ассоциированного с ревматоидным артритом, респираторного дистресс-синдрома, острого повреждения легкого, вызванного облучением легочного фиброза или пневмонита, хронического гиперчувствительного пневмонита, системного склероза, синдрома Шегрена, интерстициальных легочных заболеваний, и легочной артериальной гипертензии (РАН); или заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из гипертрофированного рубцевания и келоидов; или глазных заболеваний, компонентом которых является фиброз, выбранных из глаукомы, возрастной дегенерации желтого пятна, диабетического отека желтого пятна, заболевания сухости глаз и диабетической ретинопатии; или фиброза в кишечнике, ассоциированного с воспалительным заболеванием кишечника.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (IXb)



где R_1 представляет собой Me, Et, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ или $\text{C}\equiv\text{C}-\text{Me}$; и R_3 независимо представляет собой H, C_1-C_6 алкил, C_1-C_6 алкокси, C_3-C_8 циклоалкил, $-\text{CH}_2-(\text{C}_3-\text{C}_8\text{циклоалкил})$, галоген или циано; или его соли. Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (Xb)



где R_1 представляет собой Me, Et, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ или $\text{C}\equiv\text{C}-\text{Me}$; и R_3 независимо представляет собой H, C_1-C_6 алкил, C_1-C_6 алкокси, C_3-C_8 циклоалкил, $-\text{CH}_2-(\text{C}_3-\text{C}_8\text{циклоалкил})$, галоген или циано; или его соли.

Настоящее изобретение также относится к способу получения соединения формулы (A) или его фармацевтически приемлемой соли.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана проницаемость искусственной мембраны для соединений типичных примеров (3-12, 17-22, 25-27, 29-40, 43-49) в соответствии с настоящим изобретением и нинтеданиба (см. результа-

ты анализа проницаемости РАМРА и табл. 7: при повторении эксперимента использовали средние значения для соединений);

на фиг. 2 - общее воздействие на легкое внутривенного и внутритрахеального введения соединений примеров в соответствии с настоящим изобретением или нинтеданиба у крыс (см. результаты фармакокинетических измерений на грызунах);

на фиг. 3 - общее воздействие на легкое внутривенного и внутритрахеального введения соединений примеров в соответствии с настоящим изобретением или нинтеданиба у крыс (см. результаты фармакокинетических измерений на грызунах).

Подробное описание изобретения

Алкильные группы могут быть с разветвленной или неразветвленной цепью, C_{1-8} алкильные группы могут, например, представлять собой C_{1-6} алкил, C_{1-4} алкил или C_{1-3} алкил. Приводимые в качестве примера алкильные группы включают в себя метил, этил, н-пропил, изо-пропил, н-бутил, трет-бутил и CH_2CHMe_2 . Согласно одному варианту осуществления алкил относится к алкилу с неразветвленной цепью. Алкилен описан таким же образом, что и алкил, за исключением того, что он представляет собой двухвалентную группу.

Используемый в настоящем описании алкокси означает -Оалкил и включает в себя алкокси с неразветвленной или разветвленной цепью, например метокси, этокси, пропокси, буюкси.

Гидроксиалкил означает алкил с гидроксильным заместителем в любом положении. Примеры включают в себя гидроксиметил, 2-гидроксиэтил, 3-гидрокси-н-пропил и 4-гидрокси-н-бутил.

Галогены соответственно могут представлять собой Br, Cl или F, в частности Cl или F, в особенности F.

Примеры алифатических 4-8-членных гетероциклических колец, содержащих один или несколько гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, включают в себя азетидин, пирролидин, пиперидин, пиперазин, морфолин, диоксан, тетрагидрофуран, тиоморфолин, тетрагидропиран и diaзепан. Соответствующим образом гетероциклические кольца включают в себя 1 или 2, в частности 1 гетероатом. Такие кольца могут содержать карбонил, и примеры включают в себя пирролидинон, пиперазинон, diaзепанон и пиперидинон. Такие кольца, которые могут представлять R_4 и R_5 , могут содержать сульфоновую группу, такую как 1,1-диоксо-1-тиоморфолин-1-ил.

C_3 - C_8 циклоалкил относится к алифатическому карбоциклическому кольцу, содержащему типично от 3 до 8 кольцевых членов с необязательным разветвлением и содержащему от 3 до 8 атомов углерода в общей сложности. Примеры включают в себя циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, метилциклогексил, циклогептил и циклооктил.

4-8-членные алифатические гетероциклические кольца необязательно могут быть замещены. Согласно одному варианту осуществления кольца не являются замещенными. Согласно другому варианту осуществления кольцо несет один заместитель. Согласно другому варианту осуществления кольцо несет два заместителя. Заместитель может быть при атоме углерода или азота. Такие кольца, которые может представлять Нет или которые попадают в пределы определения спиро-С, могут быть замещены метилом. Примеры включают в себя морфолинометил, пирролидин-1-илметил, 4-метил-1,4-diazепан-2-он и 4-метилпиперазин-2-он.

Такие примеры замещенных гетероциклических колец, которые могут представлять R_4 и R_5 , включают в себя 1-метилпиперазин, 1-метилпиперидин, 1-метил-1,4-diazепан, 4-диметиламинопиперидин, 4-гидрокси-пиперидин, 1-(2-гидроксиэтил)пиперидин, 4-(гидроксиметил)пиперидин, 1-(2-метоксиэтил)пиперидин, 4,4-дифторпиперидин, 4-фторпиперидин, 1-ацетилпиперазин, 4-метил-1,4-diazепан-2-он, 1-ацетил-1,4-diazепан, 4-(диметиламино)тетрагидро-2Н-пиран, 4-(метилсульфонил)пиперазин и 3-гидрокси-1-метилпирролидин.

Спиро-С относится к четвертичному атому углерода, соединяющему два алифатических гетероциклических кольца вместе в соответствии с определением выше с образованием спиробициклического кольца. Примеры спиробициклических колец включают в себя спиро[5.5]ундекан и спиро[5.6]додекан. Примеры замещенных спиробициклических колец включают в себя 1-метил-5-оксо-1,4,9-триаза-спиро[5.5]ундекан и 7-метил-12-оксо-3,7,11-триаза-спиро[5.6]додекан.

Согласно одному варианту осуществления представлена фармацевтически приемлемая соль соединения по настоящему изобретению.

Соединения настоящего раскрытия включают в себя такие соединения, в которых конкретный атом является изотопом природного происхождения или не природного происхождения. Согласно одному варианту осуществления изотопом является устойчивый изотоп. Таким образом, соединения по настоящему изобретению включают в себя, например, такие соединения, которые содержат один или несколько атомов дейтерия вместо атомов водорода и т.п.

Раскрытие также относится ко всем полиморфным формам определенных в настоящем описании соединений, включающих их соли.

Раскрытие также относится ко всем сольватам определенных в настоящем описании соединений. Примеры сольватов включают в себя гидраты.

Соответственно, R_1 представляет собой Me.

Согласно предпочтительному варианту осуществления R_2 представляет собой группу, выбранную из H, $-C_1-C_6$ алкила, C_1-C_6 алкокси-, C_3-C_8 циклоалкил-, $-CH_2-(C_3-C_8$ циклоалкил), галогена и циано и R_3 представляет собой группу $-Z-R_x$. Согласно альтернативному варианту осуществления R_2 представляет собой группу $-Z-R_x$, и R_3 представляет собой группу, выбранную из H, $-C_1-C_6$ алкила, C_1-C_6 алкокси-, $-C_3-C_8$ циклоалкила, $-CH_2-(C_3-C_8$ циклоалкил), галогена и циано.

Приемлемо, если R_2 или R_3 не представляют собой $-Z-R_x$, а представляют собой группу, выбранную из H, C_1-C_6 алкила, C_1-C_6 алкокси-, C_3-C_6 циклоалкила, галогена и циано, более приемлемо H, C_1-C_4 алкила или галогена, еще более приемлемо H, Me или галогена, наиболее приемлемо H, Me или F, в частности H.

Согласно предпочтительному варианту осуществления Z представляет собой CO. Согласно альтернативному варианту осуществления Z представляет собой SO_2 .

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления R_x представлен формулой (i).

Соответственно, R_4 представляет собой $NR_{16}R_{17}$, m представляет собой 2, 3, 4 или 5 и R_5 представляет собой H или OH, за исключением того, что если R_5 представляет собой OH, n представляет собой 2, 3, 4 или 5.

Альтернативно, соответствующий R_4 представляет собой N-соединенный 4-8-членный алифатический гетероцикл, содержащий N и необязательно содержащий дополнительно один или несколько гетероатомов, выбранных из N, O и S, m представляет собой 2, 3, 4 или 5 и R_5 представляет собой H или OH, за исключением того, что если R_5 представляет собой OH, n представляет собой 2, 3, 4 или 5.

Соответственно, R_5 представляет собой $NR_{18}R_{19}$, n представляет собой 2, 3, 4 или 5 и R_4 представляет собой H или OH, за исключением того, что если R_4 представляет собой OH, m представляет собой 2, 3, 4 или 5.

Альтернативно, соответствующий R_5 представляет собой N-соединенный 4-8-членный алифатический гетероцикл, содержащий N и необязательно содержащий дополнительно один или несколько гетероатомов, выбранных из N, O и S, n представляет собой 2, 3, 4 или 5 и R_4 представляет собой H или OH, за исключением того, что если R_4 представляет собой OH, m представляет собой 2, 3, 4 или 5.

Соответственно, X_1 представляет собой $(CH_2)_m$.

Соответственно, X_1 представляет собой $(CH_2)_0$, CH_2 или $(CH_2)_2$, в частности $(CH_2)_0$ или CH_2 , предпочтительно $(CH_2)_0$.

Соответственно, R_4 представляет собой H или OH, в частности H.

Подходящий фрагмент $-X_1-R_4$ представляет собой H, Me или 2-гидроксиэтил, в частности H или Me, предпочтительно H.

Соответственно, Y_1 представляет собой $(CH_2)_n$.

Соответственно, Y_1 представляет собой $(CH_2)_0$, CH_2 , $(CH_2)_2$ или $(CH_2)_3$, в частности $(CH_2)_2$ или $(CH_2)_0$, предпочтительно $(CH_2)_2$.

Соответственно, R_5 представляет собой 1-метилпиперазинил, диметиламино, 1-метилпиперидинил, 1-метил-1,4-дiazепанил, 4-диметиламинопиперидинил, пиперазинонил, 4-гидроксипиперидинил, 1-(2-гидроксиэтил)пиперидинил, 1-(2-метоксиэтил)пиперидинил, 4,4-дифторпиперидинил, 1-ацетилпиперазинил, 4-фторпиперидинил, морфолинил, 1-ацетил-1,4-diazепанил, (2-метоксиэтил)(метил)амино, 4-(диметиламино)тетрагидро-2H-пиран, 1-(диметиламино)циклобутил, 4-(гидроксиэтил)пиперидинил, 4-(метилсульфонил)пиперазинил, 4-(метилсульфонил)пиперазинил, 3-гидрокси-1-метилпирролидинил, (2-гидроксиэтил)(метил)амино, 1,1-диоксидотетрагидро-2H-пиран, 5-оксо-1,4-diazепанил, метил(2-(метиламино)-2-оксоэтил)амино или 3-оксо-1,4-diazепанил, в частности 4-гидроксипиперидинил, 1-метилпиперазинил, 5-оксо-1,4-diazепанил, 1-метилпиперидинил, 1-метил-1,4-diazепанил, 4-диметиламинопиперидинил, пиперазинонил или 1-(2-гидроксиэтил)пиперидинил, предпочтительно 1-метилпиперазинил, 1-метилпиперидинил, 1-метил-1,4-diazепанил, 4-диметиламинопиперидинил, пиперазинонил или 1-(2-гидроксиэтил)пиперидинил.

Соответствующий фрагмент $-Y_1-R_5$ представляет собой $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -диметиламино, $-(CH_2)$ -(1-метил)-пиперидин-4-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил-1,4-diazепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -4-диметиламинопиперидин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -3-оксопиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-гидроксипиперидин-1-ил), 1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)$ -1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, 1-метилпиперидин-4-ил, 1-(2-метоксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)_3$ -4-метилпиперазин-1-ил, $-(CH_2)_3$ -диметиламино, $-(CH_2)_2$ -4,4-дифторпиперидин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -4-ацетилпиперазин-1-ил, 1-метилпиперидин-3-ил, $-(CH_2)_2$ -4-фторпиперидин-1-ил, $-(CH_2)_3$ -морфолин-4-ил, $-(CH_2)_2$ -4-ацетил-1,4-diazепан-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(2-метоксиэтил)(метил)амино, $-CH_2$ -(4-(диметиламино)тетрагидро-2H-пиран-4-ил), $-CH_2$ -(1-(диметиламино)циклобутил), 1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-(гидроксиэтил)пиперидин-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил), 4-гидрокси-1-метилпирролидин-3-ил, $-(CH_2)_2$ -(2-гидроксиэтил)(метил)амино, $-(CH_2)_2$ -1,1-диоксидотетрагидро-2H-пиран, $-(CH_2)_2$ -(5-оксо-1,4-diazепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(метил(2-(метиламино)-2-оксоэтил)амино), $-(CH_2)_2$ -(3-оксо-1,4-diazепан-1-ил), в частности $-(CH_2)_2$ -(4-гидроксипиперидин-1-ил), 1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)$ -1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)_2$ -(5-оксо-1,4-diazепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил-1,4-diazепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-диметиламинопиперидин-1-ил), $-(CH_2)_2$ -3-оксопиперазин-1-ил, 1-метилпиперидин-4-ил, предпочтительно $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил-1,4-

диазепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-диметиламинопиперидин-1-ил), $-(CH_2)_2$ -3-оксопиперазин-1-ил, -1-метилпиперидин-4-ил.

Соответствующая формула (i) представляет собой фрагмент, в котором: (a) $-X_1-R_4$ представляет собой H и $-Y_1-R_5$ представляет собой $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -диметиламино, $-(CH_2)$ -(1-метил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил-1,4-диазепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -4-диметиламинопиперидин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -3-оксопиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-гидроксипиперидин-1-ил), -1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)$ -1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, -1-метилпиперидин-4-ил, -1-(2-метоксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)_3$ -4-метилпиперазин-1-ил, $-(CH_2)_3$ -диметиламино, $-(CH_2)_2$ -4,4-дифторпиперидин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -4-ацетилпиперазин-1-ил, -1-метилпиперидин-3-ил, $-(CH_2)_2$ -4-фторпиперидин-1-ил, $-(CH_2)_3$ -морфолин-4-ил, $-(CH_2)_2$ -4-ацетил-1,4-диазепан-1-ил, $-(CH_2)_2$ -((2-метоксиэтил)(метил)амино), $-CH_2$ -(4-(диметиламино)тетрагидро-2H-пиран-4-ил), $-CH_2$ -(1-(диметиламино)циклобутил), $-(CH_2)_2$ -(4-(гидроксиметил)пиперидин-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил), $(CH_2)_2$ -(2-гидроксиэтил)(метил)амино, $-(CH_2)_2$ -1,1-диоксидотиоморфолино, $-(CH_2)_2$ -(5-оксо-1,4-диазепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(метил(2-(метиламино)-2-оксоэтил)амино) или $-(CH_2)_2$ -(3-оксо-1,4-диазепан-1-ил), в частности $-X_1-R_4$ представляет собой H и $-Y_1-R_5$ представляет собой $-(CH_2)_2$ -(4-гидроксипиперидин-1-ил), -1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)$ -1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил, $-(CH_2)_2$ -(5-оксо-1,4-диазепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил-1,4-диазепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-диметиламинопиперидин-1-ил), $-(CH_2)_2$ -3-оксопиперазин-1-ил, -1-метилпиперидин-4-ил, предпочтительно $-X_1-R_4$ представляет собой H и $-Y_1-R_5$ представляет собой $-(CH_2)_2$ -(4-метил)пиперазин-1-ил, $-(CH_2)_2$ -(4-метил-1,4-диазепан-1-ил), $-(CH_2)_2$ -(4-диметиламинопиперидин-1-ил), $-(CH_2)_2$ -3-оксопиперазин-1-ил, -1-метилпиперидин-4-ил; или (b) $-X_1-R_4$ представляет собой Me и $-Y_1-R_5$ представляет собой $-(CH_2)_2$ -диметиламино, -1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил или 4-гидрокси-1-метилпирролидин-3-ил, в частности $-X_1-R_4$ представляет собой Me и $-Y_1-R_5$ представляет собой $-(CH_2)_2$ -диметиламино; или (c) $-X_1-R_4$ представляет собой 2-гидроксиэтил и $-Y_1-R_5$ представляет собой $-(CH_2)_2$ -диметиламино. Фрагмент формулы (i) предпочтительно представлен при помощи (a).

Согласно одному варианту осуществления R_x представлен формулой (ii).

Соответственно, Y_2 представляет собой $(CH_2)_s$.

Соответственно, s представляет собой 2, 3 или 4, более соответствующим образом 2 или 3, в частности 2.

Согласно варианту осуществления Y_2 не замещен. Согласно варианту осуществления Y_2 замещен одной группой. Согласно варианту осуществления Y_2 замещен двумя группами, например, при том же атоме углерода.

Соответственно, X_2 представляет собой $(CH_2)_v$.

Соответственно, v представляет собой 2, 3 или 4, более соответственно 2 или 3, в частности 2.

Согласно варианту осуществления X_2 не замещен. Согласно варианту осуществления X_2 замещен одной группой. Согласно варианту осуществления X_2 замещен двумя группами, например, при том же атоме углерода.

Соответственно, Q представляет собой N, O или C, в частности N.

Соответственно, q представляет собой 0 или 1, в частности 1.

Соответственно, s представляет собой 2, v представляет собой 2 и q представляет собой 1, или s представляет собой 3, v представляет собой 2 и q представляет собой 0, или s представляет собой 2, v представляет собой 3 и q представляет собой 1, в частности s представляет собой 2, v представляет собой 2 и q представляет собой 1, или s представляет собой 3, v представляет собой 2, предпочтительно s представляет собой 2, v представляет собой 2 и q представляет собой 1.

Согласно одному варианту осуществления формула (ii) не содержит заместителей, т.е. ни один из X_2 , Y_2 и Q не замещены. Согласно одному варианту осуществления формула (ii) несет один заместитель, т.е. любой из X_2 , Y_2 или Q замещен один раз. Согласно другому варианту осуществления формула (ii) несет два заместителя, которые могут быть замещены в том же положении кольца или в разных положениях кольца т.е. X_2 , Y_2 и/или Q замещены/ы таким образом, что всего было два замещения. Заместитель может быть при атоме углерода или азота.

Подходящие заместители выбраны из Me, OH, F, ацетила, диметиламино, 2-гидроксиэтила, гидроксиметила, 2-(метиламино)-2-оксоэтила, 2-метоксиэтила, 2-(диметиламино)этилкарбамоила, $-CH_2$ -диметиламино, пирролидин-1-илметила, 2-((2-метоксиэтил)амино)-2-оксоэтила, метилсульфонила, морфолин-ометила, пиперидинила, $-CONH_2$ и 2-((2-гидроксиэтил)амино)-2-оксоэтила, в частности выбраны из Me, диметиламино и 2-гидроксиметила, предпочтительно Me.

Соответственно, Нет замещен одной или двумя группами Me, такими как одна группа Me. Альтернативно, Нет не замещен группами Me.

Соответствующая формула (ii) представляет собой 4-(2-(метиламино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-ил, 4-метилпиперазин-1-ил, 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил, 4-(1-метил-5-оксо-1,4,9-триазаспиро[5.5]ундекан-9-ил, 4-((2-(диметиламино)этил)карбамоил)пиперидин-1-ил, 4-((диметиламино)метил)-3-гидроксипиперидин-1-ил, 4-гидрокси-4-(пирролидин-1-илметил)пиперидин-1-ил, 4-((диметиламино)метил)-4-(гидроксиметил)пиперидин-1-ил, 4-(2-((2-метоксиэтил)амино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-ил, 7-метил-12-

оксо-3,7,11-триазаспиро[5.6]додекан-3-ил, 4-гидрокси-4-(морфолинометил)пиперидин-1-ил, 4-(2-гидроксиэтил)-1,4-дiazепан-1-ил, 4'-карбамоил-[1,4'-бипиперидин-1'-ил], 4-(2-((2-гидроксиэтил)амино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-ил, в частности 4'-карбамоил-[1,4'-бипиперидин-1'-ил], 4-метилпиперазин-1-ил или 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил, предпочтительно 4'-карбамоил-[1,4'-бипиперидин-1'-ил].

Согласно одному варианту осуществления R_x представлен формулой (iii).

Соответственно, Y_3 представляет собой $(CH_2)_t$.

Соответственно, t представляет собой 1, 2, 3 или 4, в частности 1 или 2, более соответствующим образом 1.

Соответствующая формула (iii) представляет собой 2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)амино, 2-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)амино или 3-(4-метилпиперазин-1-ил)-3-оксопропил)амино, в частности 2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)амино или 3-(4-метилпиперазин-1-ил)-3-оксопропил)амино, предпочтительно 2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)амино.

Соответственно, R_6 , R_7 , R_{10} и R_{11} независимо представляют собой H, $-C_1-C_4$ алкил или $-C_1-C_4$ алкилN(C_1-C_4 алкил) $_2$.

Соответственно, R_{14} и R_{15} независимо представляют собой H, $-C_1-C_4$ алкил, $-C_1-C_4$ гидроксиалкил или C_1-C_4 алкокси(C_1-C_4)алкил-.

Соответственно, R_6 представляет собой $-C_1-C_4$ алкилN(C_1-C_4 алкил) $_2$, например $-(CH_2)_2NMe_2$. Альтернативно, соответствующий R_6 представляет собой H или $-C_1-C_4$ алкил, в частности H.

Соответственно, R_7 , R_{10} и R_{11} независимо представляют собой H или C_1-C_4 алкил, в частности H.

Соответственно, R_{14} представляет собой C_1-C_4 алкокси(C_1-C_4)алкил-, например $-(CH_2)_2OMe$ или $-C_1-C_4$ гидроксиалкил, например 2-гидроксиэтил.

Соответственно, R_{14} и R_{15} независимо представляют собой H или $-C_1-C_4$ алкил, в частности H.

Соответственно, R_{16} , R_{17} , R_{18} и R_{19} независимо представляют собой $-C_1-C_4$ алкил, необязательно замещенный одной или двумя группами, например одной группой, выбранной из OH, оксо, $NR_{24}R_{25}$ и C_1-C_4 алкокси-.

Соответственно, R_{16} представляет собой Me или 2-метоксиэтил, предпочтительно Me.

Соответственно, R_{17} представляет собой Me.

Соответственно, R_{18} представляет собой Me.

Соответственно, R_{19} представляет собой Me, 2-гидроксиэтил или 2-(метиламино)-2-оксоэтил, в частности Me.

Согласно варианту осуществления R_{16} представляет собой H.

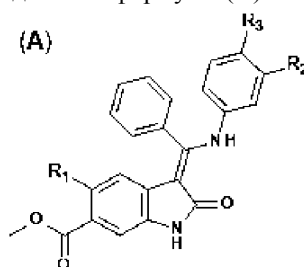
Согласно варианту осуществления R_{17} представляет собой H.

Согласно варианту осуществления R_{18} представляет собой H.

Согласно варианту осуществления R_{19} представляет собой H.

Соответственно, R_8 , R_9 , R_{12} , R_{13} , R_{20} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} и R_{25} независимо выбраны из H и Me. Согласно одному варианту осуществления R_8 , R_9 , R_{12} , R_{13} , R_{20} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} и R_{25} представляет собой H. Согласно другому варианту осуществления R_8 , R_9 , R_{12} , R_{13} , R_{20} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} и R_{25} представляет собой Me.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения представлено соединение формулы (I), которое представляет собой соединение формулы (A)

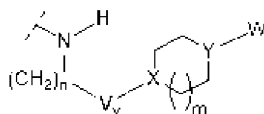


где R_1 представляет собой Me, Et, $CH=CH_2$, $C\equiv C-H$ или $C\equiv C-Me$;

один из R_2 и R_3 представляет собой группу, выбранную из H, $-C_1-C_6$ алкила, C_1-C_6 алкокси, $-C_3-C_8$ циклоалкила, $-CH_2-(C_3-C_8$ циклоалкил), галогена и циано, а другой представляет собой группу $-Z-R_x$;

Z представляет собой CO или SO_2 ;

R_x представлен формулой (iv)



где V представляет собой CO;

где v представляет собой 0 или 1;

где n представляет собой 0, 1 или 2, за исключением того, что если v представляет собой 1, n представляет собой 1 или 2;

m представляет собой 1 или 2;

X представляет собой CH или N, за исключением того, что если n представляет собой 0 или 1, X представляет собой CH;

Y представляет собой CH или N;

W представляет собой группу, выбранную из $-C_1-C_4$ алкила, $-C_1-C_4$ гидроксиалкила, C_1-C_4 алкокси(C_1-C_4)алкил-, $-C_1-C_4$ алкиленCONR₂₀R₂₁, $-C_1-C_4$ алкиленNR₂₀COR₂₁, $-SO_2(C_1-C_4)$ алкила, $-CO(C_1-C_4)$ алкила, галогена, CN, OH и NR₂₂R₂₃, за исключением того, что если W представляет собой NR₂₂R₂₃, $-C_1$ алкиленNR₂₀COR₂₁ или галоген, Y представляет собой CH;

R₂₀, R₂₁, R₂₂, R₂₃, R₂₄ и R₂₅ независимо представляют собой H или $-C_1-C_4$ алкил;

или его фармацевтически приемлемая соль.

Соответственно, R₁ представляет собой Me.

Соответственно, Z представляет собой CO.

Соответственно, R₃ представляет собой $-Z-R_x$.

Если v представляет собой 0, соответственно, n представляет собой 0 или 2, в частности 0.

Если v представляет собой 1, соответственно, n представляет собой 1.

Соответственно, v представляет собой 0.

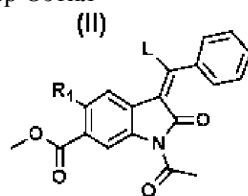
Соответственно, m представляет собой 1.

Соответственно, X представляет собой CH.

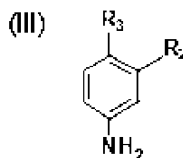
Соответственно, Y представляет собой N.

Соответственно, W представляет собой $-C_1-C_4$ алкил (в частности Me) или NR₂₂R₂₃ (в частности, NMe₂).

Соединения формулы (I) в целях удобства могут быть получены способом, включающим в себя осуществление взаимодействия соединения формулы (II), в котором L представляет собой уходящую группу, такую как $-OC_1-C_4$ алкил, например Оэтил

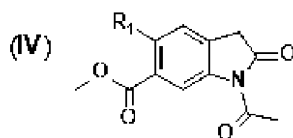


или его защищенного производного с соединением формулы (III)

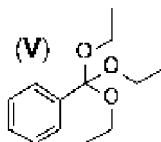


Как правило, соединения формул (II) и (III) могут взаимодействовать в присутствии растворителя, такого как DMF, и при нагревании до приблизительно 80°C в течение приблизительно 18 ч. После этой стадии проводят стадию снятия защитных групп с удалением защитной группы, ацетила. Для этого реакционная смесь может быть охлаждена до комнатной температуры и нуклеофил, такой как пиперидин, добавляли и перемешивали в течение 1-24 ч.

Соединения формулы (II), в которых L представляет собой $-O$ этил, могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы (IV)

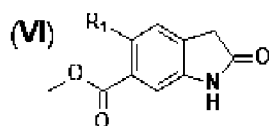


или его защищенного производного с соединением формулы (V)



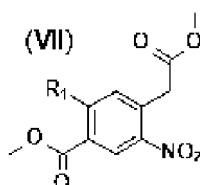
Как правило, соединения формул (IV) и (V) могут взаимодействовать в присутствии уксусного ангидрида при температуре приблизительно 110°C в течение приблизительно 4 ч. Другие соединения формулы (II) могут быть получены аналогичным способом.

Соединения формулы (IV) могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы (VI)



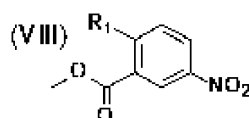
с уксусным ангидридом. Как правило, реакцию проводили при приблизительно 110°C. Альтернативно, соединения формулы (II), в которых L представляет собой -Oэтил, могут быть получены прямо из соединений формулы (VI) обработкой соединением формулы (V) в присутствии уксусного ангидрида при температуре приблизительно 110°C в течение приблизительно 4 ч.

Соединения формулы (VI) могут быть получены путем восстановления группы -NO₂ соединения формулы (VII)



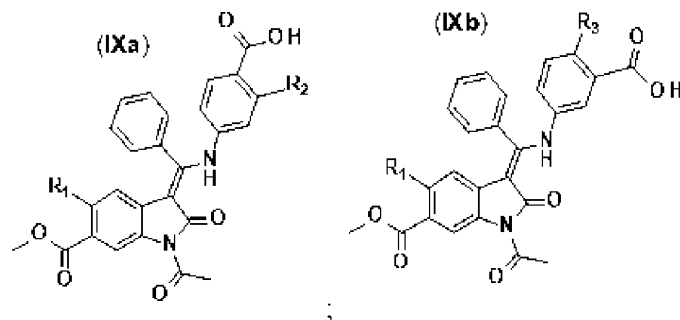
до группы -NH₂ с последующей амидобразующей циклизацией, что является хорошо известной процедурой в области техники. Условия восстановления и амидной циклизации, как правило, могут включать в себя применение H₂-Pd/C при комнатной температуре, и гидрирование при давлении 5 бар в течение приблизительно 36 ч в растворителе, таком как уксусная кислота, что является хорошо известной процедурой в области техники.

Соединения формулы (VII) могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы (VIII)



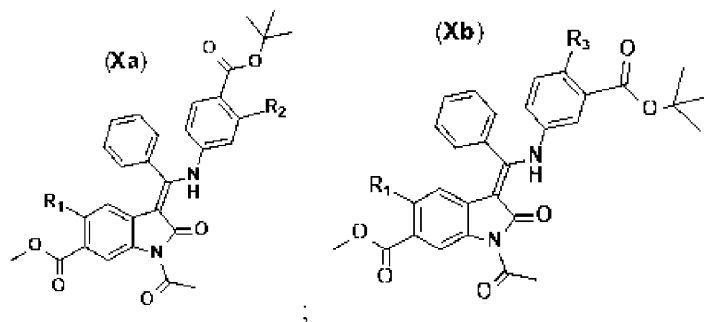
с метилхлорацетатом. Как правило, реакцию проводили в присутствии полярного органического растворителя, такого как DMF, и основания, такого как KO^tBu, в атмосфере азота от приблизительно -20 до -10°C.

Альтернативно, соединения формулы (Ia), которые являются соединениями формулы (I), в которых Z представляет собой CO, могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы (IXa) или (IXb)



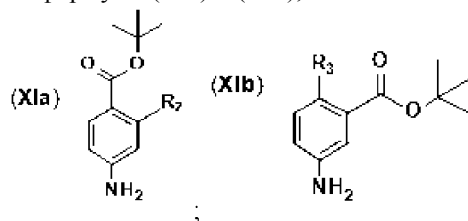
или его защищенного производного с соединением формулы H-R_x или его защищенным производным реакцией конденсации между NH-аминогруппой, присутствующей в H-R_x, и COOH в соединениях формул (IXa) и (IXb). Соединения, как правило, могут реагировать в течение приблизительно 2-18 ч при комнатной температуре в присутствии связующего вещества, такого как HATU, и основания, такого как основание Хунига (DIPEA), в полярном органическом растворителе, таком как DMF, хотя также могут быть использованы другие полярные органические растворители. За этим способом, при необходимости, может следовать снятие защитных групп.

Соединения формул (IXa) и (IXb) могут быть получены путем снятия защитных групп с соединений формул (Xa) и (Xb), соответственно



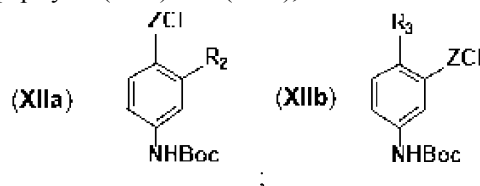
Снятие защитных групп может быть проведено с использованием стандартных реагентов области техники, таких как TFA, и соединения, как правило, перемешивали при комнатной температуре в течение приблизительно 16 ч в растворителе, таком как DCM.

Соединения формул (Xa) и (Xb) могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы (II) с соединением формулы (XIa) и (XIb), соответственно



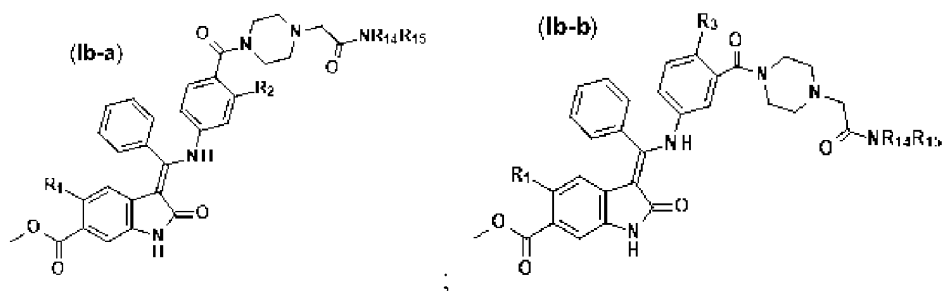
Соединения могут реагировать в присутствии DMF в течение приблизительно 18 ч при 100°C.

Соединения формулы (III) могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы H-R_x с соединением формулы (XIIa) или (XIIb), соответственно

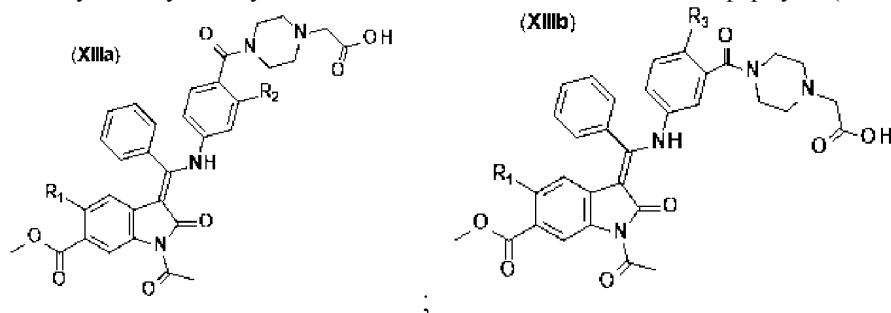


Соединения, как правило, могут реагировать в присутствии основания Хунига (DIPEA) и DMF в течение приблизительно 16 ч при комнатной температуре с последующей стадией снятия защитных групп с применением стандартных реагентов области техники, таких как TFA.

Альтернативно, соединения формулы (Ib), которые являются соединениями формулы (I), в которой Z представляет собой CO и R_x представлен формулой (ii)



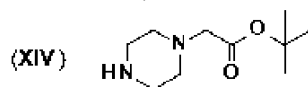
могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы (XIIIa) или (XIIIb)



с соединением NHR₁₄R₁₅. Как правило, соединения формул (XIIIa) или (XIIIb) и NHR₁₄R₁₅ могут взаимодействовать в присутствии связывающего средства, такого как HATU, и основания, такого как основание Хунига (DIPEA), в растворителе, таком как DMF, и это перемешивали при комнатной темпе-

ратуре в течение приблизительно 4 ч. После этой стадии проводили стадию снятия защитных групп с удалением защитной группы, ацетила. Для этого добавляли нуклеофил, такой как пиперидин, и перемешивали в течение 1-24 ч.

Соединения формулы (XIIIa) и (XIIIb) могут быть получены путем осуществления взаимодействия соединения формулы (IXa) и (IXb), соответственно, с соединением формулы (XIV)



Как правило, соединения формул (IX) и (XIV) могут взаимодействовать в присутствии связывающего средства, такого как HATU, и основания, такого как основание Хунига (DIPEA), в растворителе, таком как DMF, и это перемешивали при комнатной температуре приблизительно 3 ч. Снятие защитных групп с трет-бутильной группы может быть проведено с применением стандартных реагентов в области техники, таких как TFA, и соединения обычно перемешивали при комнатной температуре приблизительно 16 ч в растворителе, таком как DCM.

Новые промежуточные соединения, включая соединения формулы (II), (VII), (IXa), (IXb), (Xa), (Xb), (XIIIa) и (XIIIb), где R_1 представляет собой Me, Et, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ или $\text{C}\equiv\text{C}-\text{Me}$, и формулы (VI), где R_1 представляет собой Et, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ или $\text{C}\equiv\text{C}-\text{Me}$, и их соли заявлены как аспект настоящего изобретения.

Соединения формул (V), (VIII), (XIa), (XIb), (XIIa), (XIIb), (XIV), $\text{NHR}_{14}\text{R}_{15}$ и $\text{H}-\text{R}_x$ могут быть получены известными способами или способами, аналогичными описанным в настоящем изобретении.

Соединения формулы (I) могут быть получены или использованы в форме фармацевтически приемлемой соли, включая терапевтически активные нетоксичные кислотнo-аддитивные соли, которые соединения формулы (I) способны образовывать. Такие фармацевтически приемлемые кислотнo-аддитивные соли в целях удобства могут быть получены обработкой формы свободного основания соответствующими кислотами в подходящем растворителе или смеси растворителей. Соответствующие кислоты включают в себя, например, этансульфоновую, малеиновую, малоновую, L-виннокаменную, фумаровую, лимонную, янтарную, уксусную, трифенилуксусную, хлористоводородную, серную, фосфорную, 1-гидрокси-2-нафтойную, бромистоводородную, метансульфоновую, виннокаменную, пальмитиновую, изэтиновую, памовую, муравьиную, коричную, бензойную, аскорбиновую, галактаровую, молочную, яблочную, шавелевую, пара-толуолсульфоновую, бензолсульфоновую, пропионовую, фуранкарбоновую, фосфорную и глутаровую. В свою очередь указанные солевые формы могут быть превращены обработкой соответствующим основанием в форму свободного основания.

Настоящее изобретение относится к соединению настоящего изобретения для применения в качестве фармацевтического препарата.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению необязательно в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Разбавители и носители могут включать в себя такие, которые подходят для парентерального, перорального, местного, включая ингаляцию через рот в легкие или ингаляцию через нос, слизистого и ректального введения, и могут отличаться в зависимости от пути введения.

Согласно одному варианту осуществления композиции могут быть получены, например, для парентерального введения, например подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутридермального, внутрисуставного или перисуставного введения, в частности в форме жидких растворов или суспензий; для перорального введения, в частности в форме таблеток, капсул, порошка, гранул, твердых дисперсий или в форме жидких растворов или суспензий, включая наносуспензии; для ингаляции в легкие или нос, например легочное или внутриносное введение, в частности в форме сухих порошков, растворов, суспензий, включая наносуспензии для распыления, назальные спреи или капли, содержащие растворы или суспензии, или суспензии или растворы в виде герметизированных или не герметизированных аэрозолей; для местного или трансдермального введения, например в виде кремов, спреев, пен, гелей, мазей, жидкостей, пластырей; для введения через слизистую, например в щечную, подъязычную или влагалищную слизистую оболочку, и для ректального введения, например, в форме пены или суппозитория.

Композиции в целях удобства могут быть введены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в фармацевтической области, например, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Композиции также в целях удобства могут быть введены в сложной стандартной лекарственной форме.

Составы для парентерального введения могут содержать в качестве наполнителей стерилизованную воду или солевой раствор, буферы, регулирующие тонус средства, консерванты, антиоксиданты, регулирующие вязкость средства, алкиленгликоли, такие как пропиленгликоль, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрированные нафталины и т.п.

Композиции, подходящие для перорального введения, могут включать в себя один или несколько физиологически совместимых носителей и/или наполнителей и могут быть в твердой или жидкой форме.

Таблетки и капсулы могут быть получены со связующими средствами, такими как сироп, аравийская камедь, желатин, сорбит, трагакантовая камедь, целлюлоза или поливинилпирролидон; наполнителями, такими как лактоза, сахароза, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицин; смазывающими веществами, такими как стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль или диоксид кремния; и поверхностно-активными веществами, такими как лаурилсульфат натрия. Жидкие композиции могут содержать традиционные добавки, такие как суспендирующие средства, например сорбитный сироп, метилцеллюлоза, сахарный сироп, желатин, карбоксиметилцеллюлоза или пищевые жиры; эмульгаторы и поверхностно-активные вещества, такие как лецитин или аравийская камедь; растительные масла, такие как миндальное масло, кокосовое масло, рыбий жир или арахисовое масло; консерванты, такие как бутилированный гидроксианизол (БНА) и бутилированный гидрокситолуол (БНТ). Жидкие композиции могут быть инкапсулированы, например, в желатине с получением стандартной лекарственной формы.

Твердые пероральные лекарственные формы включают в себя таблетки, твердые капсулы из двух частей и мягкие капсулы из гибкого желатина (SEG). Такие твердые капсулы из двух частей могут быть получены, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC).

Состав в сухой оболочке, как правило, содержит желатин по меньшей мере в концентрации 40%-60%, пластификатор в приблизительной концентрации 20-30% (такой как глицерин, сорбит или пропиленгликоль) и воду в приблизительной концентрации 30-40%. Также могут присутствовать другие вещества, такие как консерванты, красители, замутнители и ароматизаторы. Жидкий наполнитель включает в себя твердое лекарственное вещество, которое было растворено, солюбилизировано или диспергировано (с суспендирующими средствами, такими как пчелиный воск, гидрированное касторовое масло или полиэтиленгликоль 4000), или жидкое лекарственное вещество в средах или комбинациях сред, таких как минеральное масло, растительные масла, триглицериды, гликоли, полиолы и поверхностно-активные вещества.

Составами для назального введения могут быть порошки, и они могут содержать наполнители, например лактозу или декстран, или могут быть водные или масляные растворы для применения в форме назальных капель или дозируемого спрея. Составы для назального введения также могут быть в форме водных суспензий или герметичных неводных растворов или суспензий. Для трансбуккального введения типичные наполнители включают в себя сахара, стеарат кальция, стеарат магния, прежелатинизированный крахмал и т.п.

Соответственно, соединение формулы (I) вводили местно в легкое. Таким образом, согласно одному варианту осуществления представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение по настоящему раскрытию, необязательно в комбинации с одним или несколькими местно приемлемыми разбавителями или носителями.

Местное введение в легкое может быть достигнуто путем применения не находящегося под давлением состава, такого как водные раствор или суспензия. Такие составы могут быть введены посредством небулайзера, который, например, может быть ручным и портативным или может служить для домашнего или больничного применения (т.е. непортативный). Состав может содержать вспомогательные средства, такие как вода, буферы, средства регулирования тоничности, средства регулирования pH, поверхностно-активные средства, консерванты, суспендирующие средства, объемообразующие средства и сорастворители. Суспензионные жидкие и аэрозольные составы (либо находящиеся под давлением, либо не находящиеся под давлением), как правило, будут содержать соединение в соответствии с настоящим изобретением в мелкоизмельченной форме, подходящей для отложения в легком, например с D_{50} 0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм. Порошки в мелкоизмельченной форме могут быть получены с помощью процесса микронизации или помола, с помощью сушки распылением, с помощью замораживания распылением или с помощью влажного помола с последующей сушкой распылением. Микронизация может быть выполнена с использованием струйной мельницы, такой как изготавливаемые компанией Hosokawa Alpine. Полученное в результате распределение размеров частиц может быть измерено с использованием лазерной дифракции (например, с прибором Malvern Mastersizer 2000S или Mastersizer 3000). Распределения размеров частиц могут быть представлены с использованием значений D_{10} , D_{50} и D_{90} . Медианное значение D_{50} распределений размеров частиц определяют как размер частиц, при котором распределение делится пополам. Измерение, полученное с помощью лазерной дифракции, более точно описывают как объемное распределение, и, следовательно, значение D_{50} , полученное с использованием этой процедуры, правильнее называть значением Dv_{50} (медианой для объемного распределения). Используемые в настоящем документе значения Dv относятся к распределениям размеров частиц, измеряемым с использованием лазерной дифракции. Подобным образом, значения D_{10} и D_{90} , используемые в контексте лазерной дифракции, считаются значениями Dv_{10} и Dv_{90} и относятся к размеру частиц, при котором 10% распределения лежат ниже значения D_{10} , а 90% распределения лежат ниже значения D_{90} , соответственно. Согласно другому варианту осуществления комбинированные частицы соединения в соответствии с настоящим раскрытием и вспомогательные средства для применения в распылении суспензионного состава могут быть составлены с помощью совместного помола и/или совместной сушки распылением соединения и вспомогательных средств вместе, при этом комбинированные частицы, содержащие и активные и вспомогательные средства, имеют D_{50} 1-10 мкм. Водные суспензионные составы для доставки в легкое

также могут содержать наносуспензии или суспензии комбинированных частиц, содержащих наночастицы.

Местное введение в легкое также может быть достигнуто путем применения находящегося под давлением аэрозольного состава. Аэрозольные составы, как правило, содержат активный ингредиент, суспендированный или растворенный в подходящем аэрозольном газе-вытеснителе, таком как хлорфторуглерод (CFC) или гидрофторуглерод (HFC). Подходящие CFC газы-вытеснители включают в себя трихлормонофторметан (газ-вытеснитель 11), дихлортетрафторметан (газ-вытеснитель 114) и дихлордифторметан (газ-вытеснитель 12). Подходящие HFC газы-вытеснители включают в себя тетрафторэтан (HFC-134a) и гептафторапропан (HFC-227). Газ-вытеснитель, как правило, составляет 40-99,5 мас.%, например 40-90 мас.% всей ингаляционной композиции. Состав может содержать вспомогательные средства, в том числе сорастворители (например, этанол) и поверхностно-активные средства или стабилизаторы (например, лецитин, сорбит триолеат и т.п.). Другие возможные вспомогательные средства включают в себя полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и т.п. Аэрозольные составы упаковывают в емкости и подходящую дозу доставляют посредством дозирующего клапана (например, поставляемые компаниями Vespak, Aptar или 3M или, в качестве альтернативы, компанией Coster или Vari). Находящиеся под давлением суспензионные составы для доставки в легкое также могут содержать наносуспензии или суспензии комбинированных частиц, включающих в себя наночастицы.

Местное введение в легкое также может быть достигнуто путем применения состава сухого порошка. Состав сухого порошка будет содержать соединение в соответствии с настоящим раскрытием в мелкоизмельченной форме, как правило, с D_{50} 0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм. Порошки в мелкоизмельченной форме могут быть получены с помощью процесса микронизации или помола, с помощью сушки распылением, с помощью замораживания распылением или с помощью влажного помола с последующей сушкой распылением. Микронизация может быть выполнена с использованием струйной мельницы, такой как изготавливаемые компанией Hosokawa Alpine. Полученное в результате распределение размеров частиц может быть измерено с использованием лазерной дифракции (например, с прибором Malvern Mastersizer 2000S или Mastersizer 3000). Состав, как правило, будет содержать один или несколько приемлемых для местного введения разбавителей, таких как лактоза, глюкоза, трегалоза или маннит (предпочтительно лактоза), обычно со сравнительно большим размером частиц, например, D_{50} 15-250 мкм. Согласно другому варианту осуществления комбинированные частицы соединения в соответствии с настоящим раскрытием и вспомогательные средства также могут быть составлены путем совместного помола и/или совместной сушки распылением соединения и вспомогательных средств вместе, при этом комбинированные частицы, содержащие как активные, так и вспомогательные средства, имеют D_{50} 1-10 мкм. Используемый в настоящем документе термин "лактоза" относится к содержащему лактозу компоненту, в том числе к α -лактозы моногидрату, β -лактозы моногидрату, безводной α -лактозе, безводной β -лактозе и аморфной лактозе. Лактозные компоненты могут быть обработаны путем микронизации, просеивания, помола, сжатия, агломерирования или сушки распылением. Также предусматриваются коммерчески доступные формы лактозы в разных формах, например, продукты Lactohale® (DFE Pharma), InhaLac® (Meggler), Pharmatose® (DFE Pharma) и Respitose® (DFE Pharma). Согласно одному варианту осуществления лактозный компонент выбран из группы, состоящей из α -лактозы моногидрата, безводной α -лактозы и аморфной лактозы. Предпочтительно лактозой является α -лактозы моногидрат.

Составы сухого порошка также могут содержать другие вспомогательные средства, такие как лейцин, стеарат натрия, стеарат калия или стеарат магния. Частицы сухого порошка могут быть комбинированными частицами и могут состоять из наночастиц в комбинированной матрице.

Состав сухого порошка, как правило, доставляют с использованием ингаляторного устройства сухого порошка (DPI). Оно может представлять собой либо устройство с однократной дозой, в котором состав присутствует в отдельных единицах или в виде капсул или блистеров, либо устройство с несколькими дозами, в котором содержатся более чем одна доза состава, или резервуар с нерасфасованным продуктом, или несколько контейнеров (например, несколько блистеров или пакетов). Типичные ингаляторы сухого порошка включают в себя SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, ELLIPTA, CLICKHALER, ECLIPSE, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, MONODOSE, BREEZHALER/NEOHALER, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TWISTER, TURBOSPIN, ELPENHALER, TURBUHALER, MIATHALER, NEXTHaler, TWISTHALER, NOVOLIZER, GENUAIR, SKYEHALER, ингалятор сухого порошка ORIEL, MICRODOSE, ACCUHALER, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

Предполагают, что соединения в соответствии с настоящим изобретением являются применимыми в лечении фиброзных заболеваний, таких как легочный фиброз и заболевания легких с фиброзным компонентом, например, выбранные из IPF, гигантоклеточной интерстициальной пневмонии, саркоидоза, кистозного фиброза, респираторного дистресс-синдрома, индуцированного лекарственным средством легочного фиброза, гранулематоза, силикоза, асбестоза, системной склеродермии, вызванного вирусом цирроза печени, выбранного из вызванного вирусом гепатита С цирроза печени, или заболеваний кожи с

фиброзным компонентом, например, выбранных из склеродермии, саркоидоза и системной красной волчанки, и особенно IPF. В более широком смысле предполагают, что соединения в соответствии с настоящим изобретением являются применимыми в лечении интерстициальных легочных заболеваний. Кроме того, предполагают, что соединения в соответствии с настоящим изобретением применимы в лечении заболеваний, характеризующихся гиперпролиферацией клеток, например злокачественная опухоль, и при этом соединения доставляют путем ингаляции, в частности, при злокачественной опухоли легкого. Более того, соединения в соответствии с настоящим изобретением также могут быть применимы в лечении респираторных нарушений, в том числе COPD (включая хронический бронхит и эмфизему), астмы, астмы у детей, аллергического ринита, ринита, синусита, особенно астмы, хронического бронхита и COPD.

Также предполагают, что соединения в соответствии с настоящим изобретением являются применимыми в лечении других фиброзных заболеваний, таких как легочный фиброз, ассоциированный с ревматоидным артритом, респираторным дистресс-синдромом, в том числе острым респираторным дистресс-синдромом, острым повреждением легкого, вызванным облучением легочным фиброзом или пневмонитом, хроническим пневмонитом гиперчувствительности, системным склерозом, синдромом Шегрена, интерстициальными легочными заболеваниями, легочной артериальной гипертензией (РАН), в том числе сосудистым компонентом РАН, или с заболеваниями кожи с фиброзным компонентом, например, выбранными из гипертрофированного рубцевания и келоидов, или с глазными заболеваниями, компонентом которых является фиброз, включающими в себя глаукому, возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетический отек желтого пятна, заболевание сухости глаз и диабетическую ретинопатию, или с фиброзом в кишечнике, например, ассоциированным с воспалительным заболеванием кишечника.

Кроме того, предполагают, что соединения в соответствии с настоящим изобретением являются применимыми в предупреждении заболеваний, характеризующихся гиперпролиферацией клеток, например злокачественная опухоль, например, при которых соединения доставляют путем ингаляции, в частности, злокачественная опухоль легкого.

Настоящее изобретение относится к соединению в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении одного или нескольких из упомянутых выше заболеваний. Настоящее изобретение также относится к применению соединения в соответствии с настоящим изобретением в изготовлении медикамента для лечения одного или нескольких из упомянутых выше заболеваний.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения одного из упомянутых выше заболеваний, который предусматривает введение субъекту (особенно субъекту-человеку), нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "лечение" означает профилактику, а также терапевтическое лечение.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены один раз, два раза или три раза в сутки, особенно один раз или два раза в сутки. Подходящая величина дозировки может быть определена с учетом тяжести заболевания и размера субъекта. Типичные величины дозировки находятся в диапазоне от 0,01 до 100 мг, например от 0,1 до 10 мг, например от 0,25 до 5 мг, на человеческую дозу, подлежащую доставке один раз, два раза или три раза в сутки, особенно один раз или два раза в сутки.

Соединение в соответствии с настоящим раскрытием также может быть введено в комбинации с одним или несколькими другими активными ингредиентами, например, активными ингредиентами, подходящими для лечения упомянутых выше состояний. Например, возможные активные ингредиенты включают в себя нинтеданиб или пирфенидон (они известны для лечения IPF). Другие активные ингредиенты, подлежащие использованию в комбинации, включают в себя вещества с секретолитической, бронхолитической и/или противовоспалительной активностью, такие как антихолинергические средства, β -2 миметики, стероиды, ингибиторы PDE-IV, ингибиторы p38 MAP киназы, ингибиторы MK2, ингибиторы галектина, антагонисты NK₁, антагонисты LTD4, ингибиторы EGFR, ингибиторы VEGF, ингибиторы PDGF, ингибиторы FGF, ингибиторы TGF β , антагонисты LPA1, ингибиторы LOXL2, ингибиторы CTGF, пентоксифиллин, N-ацетилцистеин, средства против IL13, средства против IL4, ингибиторы интегрин α v β 6, ингибиторы IGF, ингибиторы PI3K, ингибиторы mTOR, ингибиторы JNK, пентаксин-2 и антагонисты эндотелина.

Другие активные ингредиенты, подлежащие использованию в комбинации, включают в себя вещества с противофиброзной активностью, такие как ингибиторы PDE-III, комбинированные средства против IL4/13, комбинированные ингибиторы PI3K/mTOR, ингибиторы аутоксина, антагонисты P2X3, антагонисты CTGF, антагонисты 5-LO, антагонисты лейкотриена и ингибиторы ROCK.

Согласно одному варианту осуществления комбинацию активных ингредиентов составляют совместно.

Согласно одному варианту осуществления комбинацию активных ингредиентов совместно вводят последовательно или одновременно.

Согласно одному варианту осуществления соединения в соответствии с настоящим изобретением доставляют путем ингаляции, а другие возможные активные ингредиенты доставляют перорально или парентерально.

Один вариант осуществления относится к комбинированному продукту, содержащему:

- (А) соединение в соответствии с настоящим изобретением; и
- (В) дополнительный активный ингредиент (упомянутый выше),

при этом каждый из компонентов (А) и (В) составляют в смеси с фармацевтически приемлемым разбавителем(ями) или носителем(ями). Комбинация необязательно может содержать дополнительные соответствующие вспомогательные средства.

Один вариант осуществления относится к соединению в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве медицинского препарата, подлежащего введению в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами (упомянутыми выше).

Соединения в соответствии с настоящим изобретением, как предполагают, обладают одним или несколькими из следующих полезных свойств:

- хорошая ингибиторная активность в отношении киназ, выбранных из VEGFR (например, VEGFR1 и VEGFR2), FGFR и PDGFR;

- хорошая противофиброзная активность, например, как определено на *in vivo* моделях (например, на модели вызванного блеомицином фиброза) при доставке местным путем в легкое;

- подходящие физические и химические свойства, а также низкая доза для медицинского продукта, в частности, предназначенного для доставки местным путем в легкое;

- хорошее время нахождения в легком или продолжительность действия при введении местным путем в легкое;

- низкая проницаемость при анализе проницаемости PAMPA;

- хорошая продолжительность действия, например, как измерено с помощью ингибирования индуцированного PDGF-BB фосфорилирования BDGFRP в фибробластных клетках легкого человеческого плода;

- хорошая безопасность и переносимость при введении местным путем в легкое;

- низкая пероральная биодоступность.

Экспериментальный раздел.

Используемые в изобретении аббревиатуры определены ниже (табл. 1). Предусмотрено, что любые неопределенные аббревиатуры обладают своим общепринятым значением.

Таблица 1. Аббревиатуры

AcOH - ледяная уксусная кислота;

водн. - водный;

br - широкий;

BEH - этиленовый мостиковый гибрид;

Boc - трет-бутоксикарбонил;

CSH - гибрид с заряженной поверхностью;

конц. - концентрированный;

d - дублет;

δ - химический сдвиг;

DCM - дихлорметан;

DIAD - диизопропилазодикарбоксилат;

DMF - N,N-диметилформамид;

DMSO - диметилсульфоксид;

(ES⁺) - ионизация электрораспылением, режим определения положительных ионов;

(ES⁻) - ионизация электрораспылением, режим определения отрицательных ионов;

Et - этил;

EtOAc - этилацетат;

EtOH - этанол;

ч - час(ы);

HATU - 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний 3-оксид гексафторфосфат;

основание Хунига - N,N-диизопропилэтиламин;

M - молярный;

m - мультиплет;

(M+H)⁺ - протонированный молекулярный ион;

(M-H)⁻ - депротонированный молекулярный ион;

Me - метил;

MeCN - ацетонитрил;

MeOH - метанол;

МГц - мегагерц;

мин - минута(ы);

m/z - отношение массы к заряду;

ЯМР - ядерно-магнитный резонанс (спектроскопия);

p - пентуплет;

Ph - фенил;

Py - пиридин;
 q - квартет;
 к.т. - комнатная температура;
 HPLC - высокоэффективная жидкостная хроматография;
 s - синглет;
 нас. - насыщенный;
 SAX - анионнообменная (смола) с твердой основой;
 SCX - катионнообменная (смола) с твердой основой;
 t - триплет;
^tBu - трет-бутил;
 THF - тетрагидрофуран;
 TFA - трифторуксусная кислота;
 UV - УФ излучение;
 мас. - масса.
 Химические примеры.
 Общие способы.

Все исходные вещества и растворители получали или из коммерческих источников, или получали согласно ссылкам из литературы. Если не отмечено иное, все реакционные смеси перемешивали. Органические растворы обычным способом сушили над безводным сульфатом магния. Гидрирование выполняли на проточном реакторе Thales H-cube при установленных условиях или под давлением в газовом автоклаве (сосуд высокого давления).

Колоночную хроматографию выполняли на картриджах с расфасованным диоксидом кремния (230-400 меш, 40-63 мкм) с применением указанного количества. SCX закупали у Supelco и обрабатывали 1M хлористоводородной кислотой перед применением. Если не отмечено иное, очищаемую реакционную смесь сначала разбавляли MeOH и делали кислотной при помощи нескольких капель AcOH. Этот раствор загружали сразу в SCX и промывали MeOH. Требуемое вещество затем элюировали промыванием 1%NH₃ в MeOH.

Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой.

Проводили с применением UV определения при 215 и 254 нм или с Waters X-Select Prep-C18, 5 мкм, 19×50 мм колонкой с элюированием градиентом H₂O-MeCN с содержанием 0,1% об./об. муравьиной кислоты в течение 10 мин (способ А), или с Waters X-Bridge Prep-C18, 5 мкм, 19×50 мм с элюированием градиентом H₂O-MeCN с содержанием 0,1% бикарбоната аммония в течение 10 мин (способ В).

Аналитические способы.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой.

Способ 1. Waters XSelect CSH C18 2,5 мкм (4,6×30 мм) при 40°C; скорость потока 2,5-4,5 мл мин⁻¹ элюирование с градиентом H₂O-MeCN с содержанием 0,1% об./об. муравьиной кислоты в течение 4 мин с применением UV определения при 254 и 215 нм. Информация о градиенте: 0-3,00 мин, с уклоном от 95% H₂O-5% MeCN до 5% H₂O-95% MeCN; 3,00-3,01 мин, поддержание при 5% H₂O-95% MeCN, скорость потока увеличивалась до 4,5 мл мин⁻¹; 3,01-3,50 мин, поддержание при 5% H₂O-95% MeCN; 3,50-3,60 мин, с возвратом до 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока уменьшалась до 3,50 мл мин⁻¹; 3,60-3,90 мин, поддержание при 95% H₂O-5% MeCN; 3,90-4,00 мин, поддержание при 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока уменьшалась до 2,5 мл мин⁻¹.

Способ 2. Waters XBridge BEH C18, 2,5 мкм (4,6×30 мм) при 40°C; скорость потока 2,5-4,5 мл мин⁻¹, элюирование с градиентом H₂O-MeCN с содержанием 10 mM бикарбоната аммония в течение 4 мин с применением UV определения при 254 нм. Информация о градиенте: 0-3,00 мин, с уклоном от 95% H₂O-5% MeCN до 5% H₂O-95% MeCN; 3,00-3,01 мин, поддержание при 5% H₂O-95% MeCN, скорость потока увеличивалась до 4,5 мл мин⁻¹; 3,01-3,50 мин, поддержание при 5% H₂O-95% MeCN; 3,50-3,60 мин, с возвратом до 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока уменьшалась до 3,50 мл мин⁻¹; 3,60-3,90 мин, поддержание при 95% H₂O-5% MeCN; 3,90-4,00 мин, поддержание при 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока уменьшалась до 2,5 мл мин⁻¹.

Спектроскопия ¹H ЯМР.

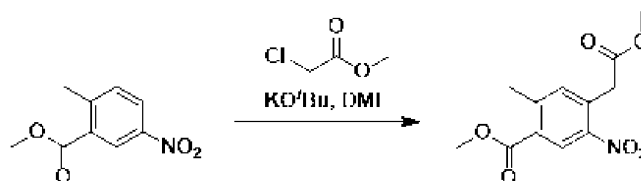
Спектры ¹H ЯМР получали на спектрометре Bruker Avance III при 400 МГц с применением остаточного недеитерированного растворителя в качестве эталона и, если не отмечено иное, проводили в DMSO-d₆.

Все химические названия были образованы с применением CambridgeSoft ENotebook 12.0.

Путь 1А.

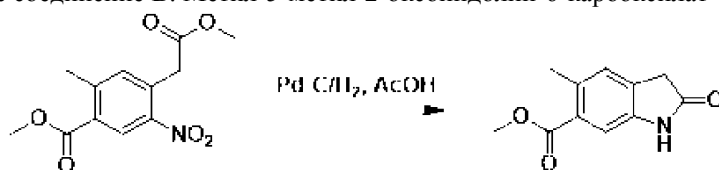
Пример 1. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-(N-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)сульфамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,8 формаат.

Промежуточное соединение А. Метил-4-(2-метокси-2-оксоэтил)-2-метил-5-нитробензоат



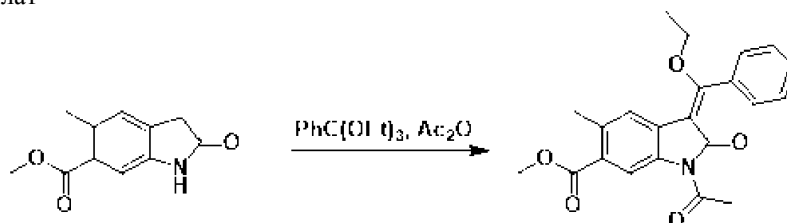
К перемешиваемому раствору трет-бутилата калия (35,9 г, 320 ммоль) в DMF (350 мл) в атмосфере азота при -20°C по каплям добавляли раствор метил-2-метил-5-нитробензоата (25,0 г, 128 ммоль) и метил-2-хлорацетата (16,9 мл, 192 ммоль) в DMF (300 мл) в течение 40 мин. Реакционную смесь нагревали до -10°C в течение 2 ч, а затем выливали во взвесь льда и HCl (900 г льда, 500 мл, 35 мас.% HCl). Смесь экстрагировали при помощи DCM (2×600 мл) и объединенные органические слои промывали соевым раствором (2×400 мл), а затем выпаривали при пониженном давлении. Полученный таким образом неочищенный продукт очищали методом колоночной флеш-хроматографии (SiO_2 , 330 г, 0-10% EtOAc в DCM, градиентное элюирование) с получением указанного соединения метил-4-(2-метокси-2-оксоэтил)-2-метил-5-нитробензоата в виде оранжевого сиропа (31,0 г, 89%); R^t 2,06 мин (способ 1); m/z 266 (M-H)⁻ (ES⁻); ^1H ЯМР δ : 2.61 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.88 (3H, s), 4.12 (2H, s), 7.59 (1H, s), 8.51 (1H, s).

Промежуточное соединение В. Метил-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



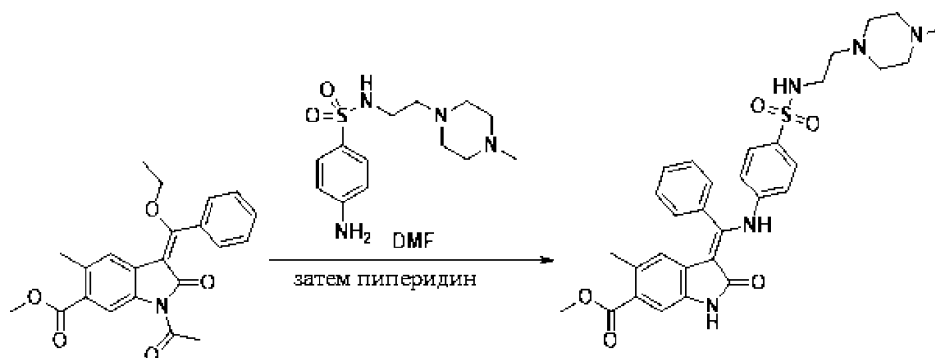
К раствору метил-4-(2-метокси-2-оксоэтил)-2-метил-5-нитробензоата (промежуточное соединение В) (23,0 г, 86,0 ммоль) в уксусной кислоте (301 мл, 5,25 моль) добавляли палладиевый катализатор на углеродном носителе [5 мас.%, 58% воды, тип 87L] (3,30 г, 1,55 ммоль). Смесь гидрировали при к.т. в атмосфере H_2 (5 бар) в течение 36 ч, а затем фильтровали через слой целита. Фильтрационный кек промывали EtOAc (500 мл) и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток растворяли в горячем MeOH с нагреванием с обратным холодильником (200 мл) и смесь охлаждали до к.т. Полученное твердое вещество фильтровали, промывали MeOH (200 мл) и сушили в вакууме с получением указанного соединения метил-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата в виде коричневого порошка (7,00 г, 39%); R^t 1,48 мин (способ 1); m/z 206 (M+H)⁺ (ES⁺); ^1H ЯМР δ : 2.45 (3H, s), 3.32 (2H, s), 3.81 (3H, s), 7.17 (1H, s), 7.22 (1H, s), 10.43 (1H, s).

Промежуточное соединение С. (Е)-Метил-1-ацетил-3-(этоксифенилметил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



К перемешиваемому раствору метил-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата (промежуточное соединение С) (5,00 г, 24,4 ммоль) в уксусном ангидриде (50,6 мл, 536 ммоль) добавляли (триэтоксиметил)бензол (22,1 мл, 97,0 ммоль) и смесь перемешивали при 110°C в течение 3 ч. Затем перемешивание продолжали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток перетирали в порошок с MeOH (50 мл). Полученное твердое вещество фильтровали, промывали MeOH (50 мл) и сушили в вакууме с получением указанного соединения (Е)-метил-1-ацетил-3-(этоксифенилметил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата в виде желтого порошка (4,50 г, 48%); R^t 2,70 мин (способ 1); m/z 380 (M+H)⁺ (ES⁺); ^1H ЯМР δ : 1.35 (3H, t), 2.42 (3H, s), 2.58 (3H, s), 3.84 (3H, s), 4.01 (2H, q), 7.45-7.62 (5H, перекрывающийся m), 7.90 (1H, s), 8.64 (1H, s).

(Z)-Метил-5-метил-3-(((4-(N-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)сульфамойл)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,8 формат

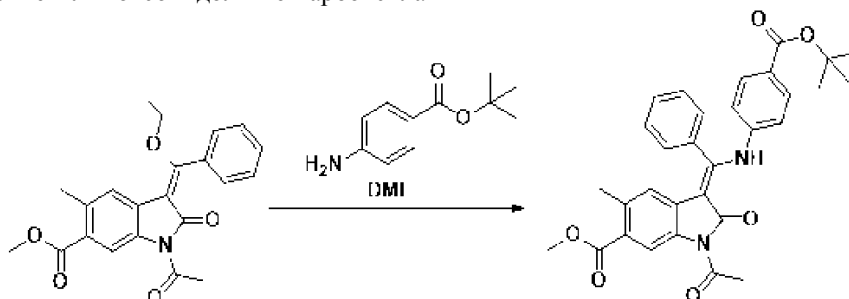


Смесь (Е)-метил-1-ацетил-3-(этокси(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата (промежуточное соединение С) (100 мг, 0,264 ммоль) и 4-амино-N-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)бензолсульфонамида, ди-трифторацетатной соли (387 мг, 0,316 ммоль) в DMF (3 мл) нагревали при 80°C в течение 16 ч. Добавляли пиперидин (261 мкл, 2,64 ммоль) и смесь перемешивали при к.т. в течение 2 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток растворяли в 10% MeOH в растворе DCM (20 мл) и промывали водой (20 мл). Слои разделяли с применением картриджа фазового сепаратора и органический слой концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-5-метил-3-(((4-(N-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)сульфоамил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, 0,8 формиат в виде светло-желтого твердого вещества (25 мг, 14%); R^t 1,58 мин (способ 1); m/z 590 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ : 2.14 (6H, s), 2.17-2.35 (8H, перекрывающийся m), 2.74-2.82 (2H, m), 3.76 (3H, s), 5.64 (1H, s), 6.96 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.41 (1H, m), 7.50-7.59 (4H, перекрывающийся m), 7.60-7.73 (3H, перекрывающийся m), 8.19 (0.8H, s), 10.92 (1H, s), 12.24 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем).

Путь 1В.

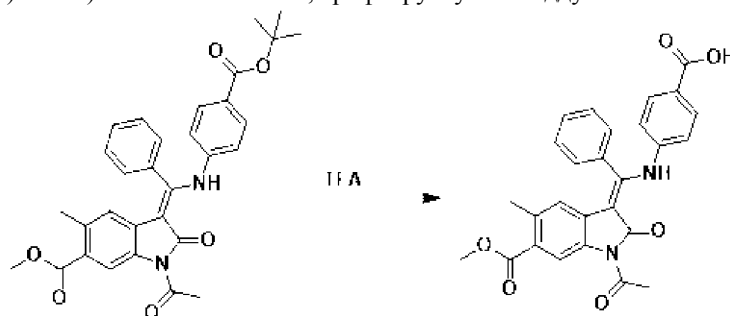
Пример 2. (Z)-Метил-3-(((4-((2-(диметиламино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат.

Промежуточное соединение D. (Z)-Метил-1-ацетил-3-(((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



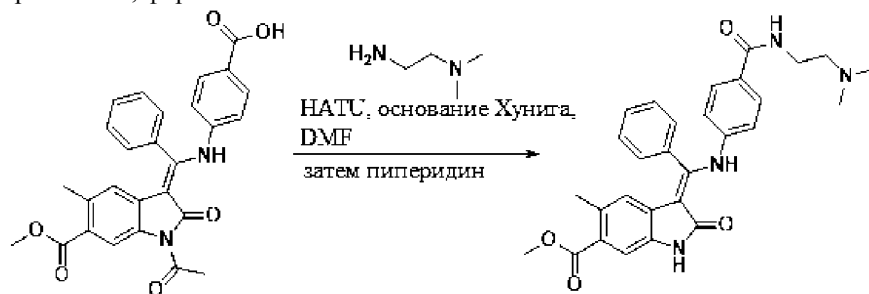
Смесь (Е)-метил-1-ацетил-3-(этокси(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата (промежуточное соединение С) (1,00 г, 2,64 ммоль) и трет-бутил-4-аминобензоата (509 мг, 2,64 ммоль) в DMF (9 мл) нагревали при 100°C в течение 18 ч. После охлаждения до к.т. осадок собирали фильтрацией, промывали Et₂O (10 мл) и сушили в вакууме с получением указанного соединения (Z)-метил-1-ацетил-3-(((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата в виде желтого твердого вещества (1,20 г, 86%); R^t 3,23 мин (способ 1); m/z 527 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ : 1.50 (9H, s), 2.13 (3H, s), 2.73 (3H, s), 3.78 (3H, s), 5.54 (1H, s), 7.04 (2H, m), 7.51 (2H, m), 7.58-7.72 (5H, перекрывающийся m), 8.68 (1H, s), 11.89 (1H, s).

Промежуточное соединение E. (Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойная кислота, трифторуксусный аддукт



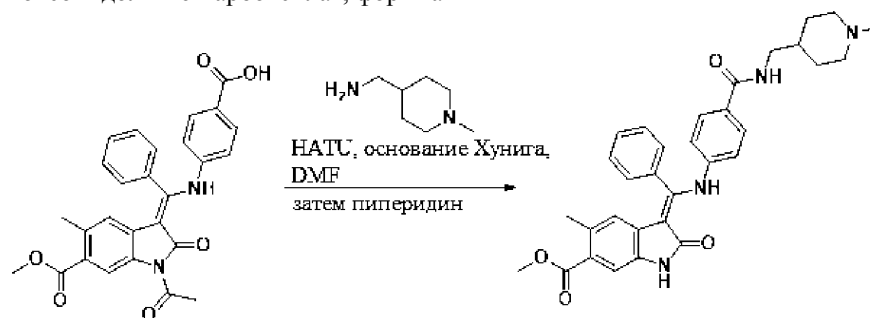
К раствору (Z)-метил-1-ацетил-3-(((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата (промежуточное соединение O) (1,20 г, 2,28 ммоль) в DCM (14 мл) добавляли TFA (1,76 мл, 22,8 ммоль) и смесь перемешивали при к.т. в течение 72 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением указанного соединения (Z)-4-(((1-ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойной кислоты, трифторуксусного аддукта, в виде желтого твердого вещества (1,00 г, 72%); R^t 2,72 мин (способ 1); m/z 471 ($M+H$)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ : 2.13 (3H, s), 2.73 (3H, s), 3.78 (3H, s), 5.54 (1H, s), 7.04 (2H, m), 7.50 (2H, m), 7.57-7.76 (5H, перекрывающийся m), 8.68 (1H, s), 11.89 (1H, s), 12.89 (1H, s).

(Z)-Метил-3-(((4-((2-(диметиламино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат



(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73,2 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин. Затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,027 ммоль) и N¹,N¹-диметилаэтан-1,2-диамин (37,8 мкл, 0,346 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 16 ч. Добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 4 ч и реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO₃ (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-3-(((4-((2-(диметиламино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, формиата, в виде светло-желтого твердого вещества (3,7 мг, 5%); R^t 1,53 мин (способ 1); m/z 499 ($M+H$)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ : 2.14 (3H, s), 2.80 (6H, s), 3.17-3.23 (2H, перекрывающийся m), 3.50-3.56 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.63 (1H, s), 6.90 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.56-7.72 (5H, перекрывающийся m), 8.56 (1H, m), 10.89 (1H, s), 12.22 (1H, s).

Пример 3. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-(((1-метилпиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат



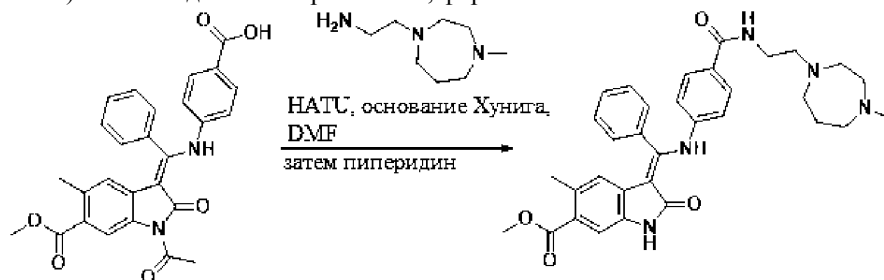
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73,2 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин. Затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,02 ммоль) и (1-метилпиперидин-4-ил)метанамин (32,9 мг, 0,257 ммоль) в DMF (0,2 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 16 ч. Добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 4 ч и реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO₃ (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-5-метил-3-(((4-(((1-метилпиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, формиата, в виде светло-желтого твердого вещества (19 мг, 25%); R^t 1,55 мин (способ 1); m/z 539 ($M+H$)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ : 1.11-1.28 (2H, перекрывающийся m), 1.53 (1H, m), 1.60-1.73 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.15-2.24 (2H, перекрывающийся m), 2.34 (3H, s), 2.89-3.00 (2H, перекрывающийся m), 3.09 (2H, t), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.58-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.17 (1H, s), 8.36 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s).

Пример 4. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



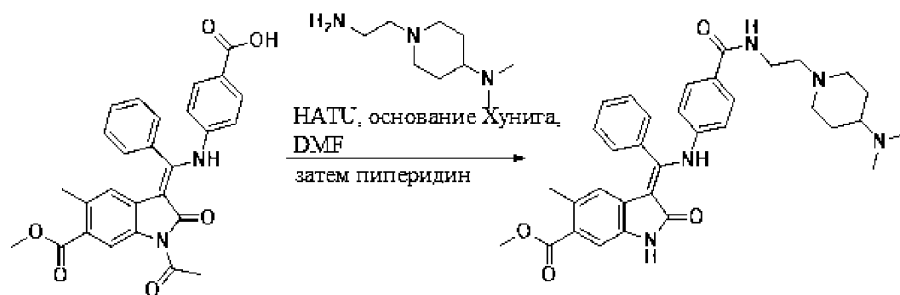
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 2-(4-метилпиперазин-1-ил)этанамин (50 мг, 0,346 ммоль) в DMF (0,5 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата в виде светло-желтого твердого вещества (19 мг, 25%); R^t 1,46 мин (способ 1); m/z 554 ($M+H$)⁺ (ES^+); 1H ЯМР δ : 2.13 (3H, s), 2.21 (3H, s), 2.32-2.46 (8H, перекрывающийся m), 3.27-3.34 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.56-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.26 (1H, t), 10.87 (1H, s), 12.22 (1H, s).

Пример 5. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат



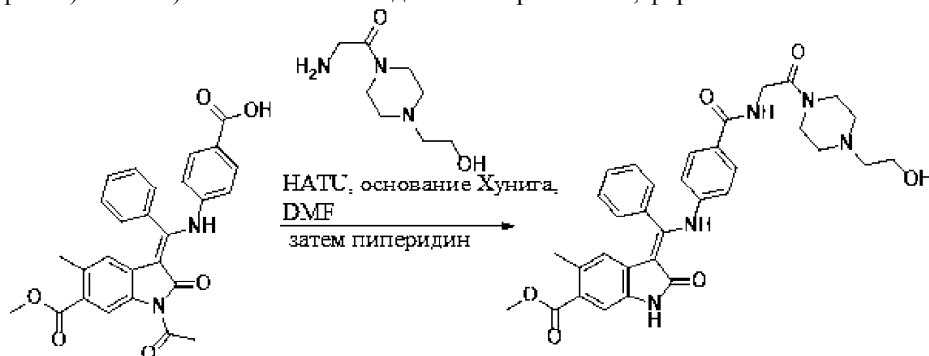
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 2-(4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)этанамин (54,5 мг, 0,346 ммоль) в DMF (0,5 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 10-40% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, формиата, в виде светло-желтого твердого вещества (27 мг, 34%); R^t 1,29 мин (способ 1); m/z 568 ($M+H$)⁺ (ES^+); 1H ЯМР δ : 1.68-1.77 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.58 (2H, t), 2.61-2.74 (8H, перекрывающийся m), 3.23-3.32 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.56-7.71 (5H, перекрывающийся m), 8.20 (1H, s), 8.24 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.22 (1H, s).

Пример 6. (Z)-Метил-3-(((4-((2-(4-(диметиламино)пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат



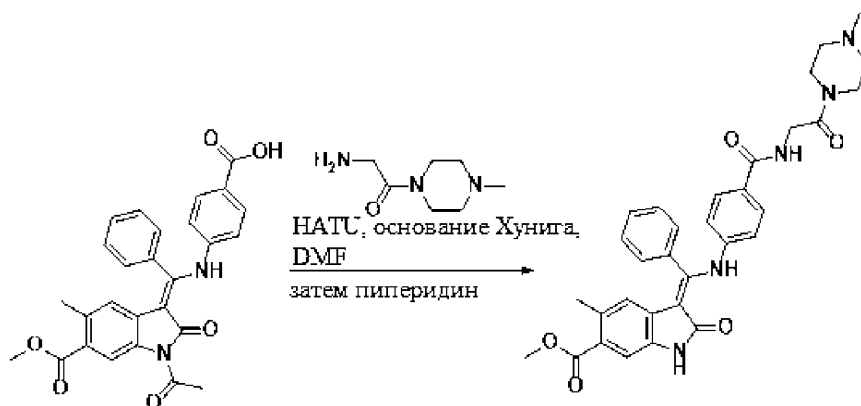
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 1-(2-аминоэтил)-N,N-диметилпиперидин-4-амин (59,3 мг, 0,346 ммоль) в DMF (0,2 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 1 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 10-40% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-(диметиламино)пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, формиата, в виде светло-желтого твердого вещества (20 мг, 24%); R^t 1,26 мин (способ 1); m/z 582 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ : 1.29-1.44 (2H, перекрывающийся m), 1.65-1.77 (2H, перекрывающийся m), 1.86-1.98 (2H, перекрывающийся m), 2.14 (3H, s), 2.24 (6H, s), 2.40 (2H, t), 2.85-2.95 (2H, перекрывающийся m), 3.76 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.22 (1H, s), 8.28 (1H, t), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 3H-предполагаемого затемнения растворителем).

Пример 7. (Z)-Метил-3-(((4-((2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат



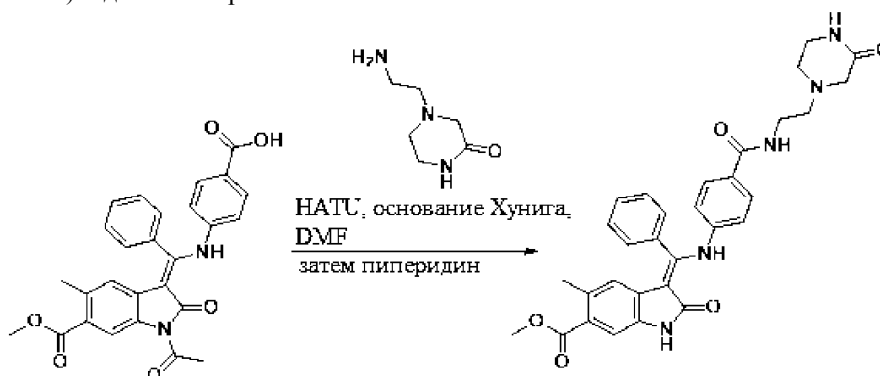
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 2-амино-1-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)этанон, 2 HCl (90 мг, 0,346 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, формиата, в виде светло-желтого твердого вещества (24 мг, 27%); R^t 1,51 мин (способ 1); m/z 598 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ : 2.14 (3H, s), 2.90-3.58 (8H, перекрывающийся m), 3.68-3.79 (5H, перекрывающийся m), 4.00-4.45 (4H, перекрывающийся m), 5.40 (1H, br s), 5.63 (1H, s), 6.90 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.52 (1H, s), 9.63 (1H, br s), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s).

Пример 8. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,5 формиат



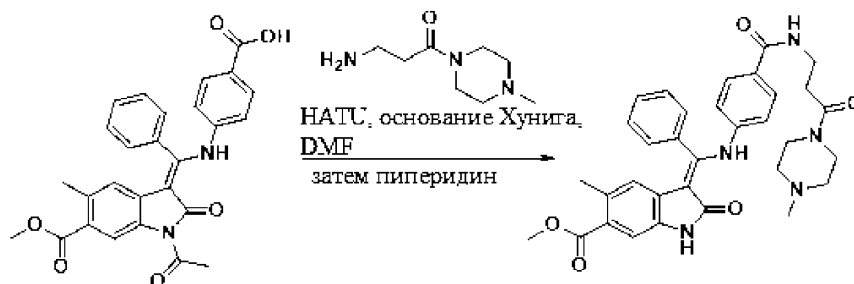
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 2-амино-1-(4-метилпиперазин-1-ил)этанон, 2 HCl (80 мг, 0,346 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, 0,5 формата, в виде светло-желтого твердого вещества (28 мг, 36%); R^1 1,52 мин (способ 1); m/z 568 ($M+H$)⁺ (ES⁺); ^1H ЯМР δ : 2.14 (3H, s), 2.26 (3H, s), 2.31-2.46 (4H, перекрывающийся m), 3.41-3.54 (4H, перекрывающийся m), 3.76 (3H, s), 4.06 (2H, d), 5.64 (1H, s), 6.89 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.13 (0.5H, s), 8.46 (1H, t), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s).

Пример 9. (Z)-Метил-5-метил-2-оксо-3-(((4-((2-(3-оксопиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-индолин-6-карбоксилат



(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 4-(2-аминоэтил)пиперазин-2-он (49,6 мг, 0,346 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ А, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-5-метил-2-оксо-3-(((4-((2-(3-оксопиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-индолин-6-карбоксилата в виде светло-желтого твердого вещества (43 мг, 58%); R^1 1,59 мин (способ 1); m/z 554 ($M+H$)⁺ (ES⁺); ^1H ЯМР δ : 2.14 (3H, s), 2.40-2.63 (2H, перекрывающийся m), 2.96 (1H, m), 3.13 (1H, m), 3.20-3.48 (4H, перекрывающийся m), 3.58 (1H, m), 3.75 (3H, s), 3.99 (1H, m), 5.62 (1H, s), 6.89 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.27-8.63 (2H, перекрывающийся m), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s).

Пример 10. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((3-(4-метилпиперазин-1-ил)-3-оксопропил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-индолин-6-карбоксилат



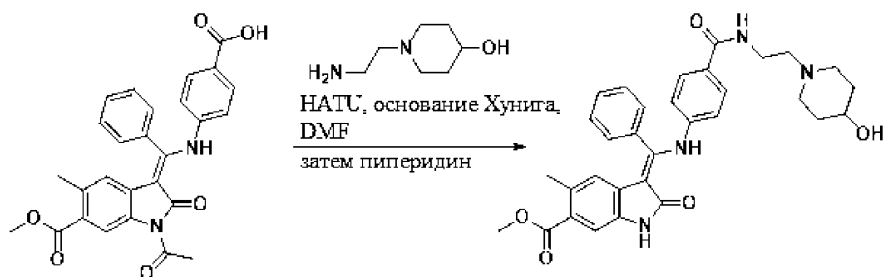
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторукусный аддукт (промежуточное соединение E) (800 мг, 1,37 ммоль) и HATU (781 мг, 2,05 ммоль) в DMF (6 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (1,43 мл, 8,21 ммоль) и 3-амино-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-1-он (223 мг, 1,30 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (1,35 мл, 13,7 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между 10% MeOH в DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Вещество загружали в картридж SCX в MeOH (10 мл). Колонку промывали MeOH (30 мл) и фильтрат удаляли. Продукт элюировали 1% аммиаком в MeOH. Растворитель выпаривали и остаток очищали методом колоночной флеш-хроматографии (SiO_2 , 80 г, 0-30% 1% аммиака в MeOH в DCM, градиентное элюирование) с получением (Z)-метил-5-метил-3-(((4-(4-(2-(метиламино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат в виде светло-желтого твердого вещества (386 мг, 48%); R^t 1,60 мин (способ 1); m/z 582 ($\text{M}+\text{H}^+$) (ES^+); ^1H ЯМР δ : 2.13 (3H, s), 2.15 (3H, s), 2.21 (2H, t), 2.24 (2H, t), 2.53 (2H, t), 3.35-3.45 (6H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.51 (2H, m), 7.57-7.68 (5H, перекрывающийся m), 8.37 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.21 (1H, s).

Пример 11. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-(4-(2-(метиламино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторукусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и N-метил-2-(пиперазин-1-ил)ацетамид (54,5 мг, 0,346 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ A, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-5-метил-3-(((4-(4-(2-(метиламино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат в виде светло-желтого твердого вещества (8,8 мг, 12%); R^t 1,59 мин (способ 1); m/z 568 ($\text{M}+\text{H}^+$) (ES^+); ^1H ЯМР δ : 2.13 (3H, s), 2.61-2.70 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.60 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.24 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.71 (3H, перекрывающийся m), 8.26 (1H, br s), 10.87 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 9H-предполагаемого затемнения растворителем).

Пример 12. (Z)-Метил-3-(((4-(4-(2-(метиламино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,8 формат



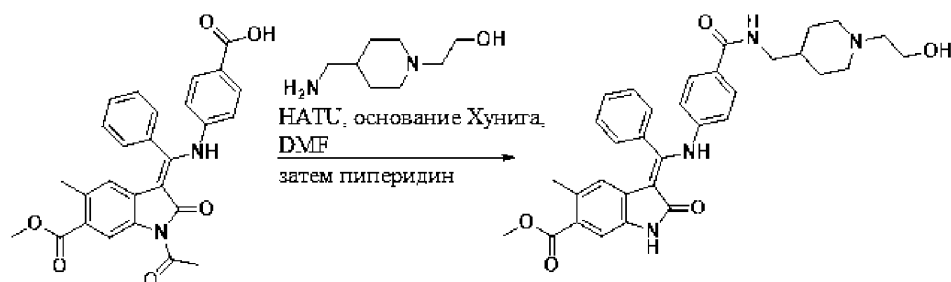
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 1-(2-аминоэтил)пиперидин-4-ол (50 мг, 0,346 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом препаративной HPLC (способ A, 20-50% MeCN в воде) с получением указанного соединения (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-гидроксипиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата, 0,8 формата, в виде светло-желтого твердого вещества (9 мг, 11%); R^t 1,54 мин (способ 1); m/z 555 ($M+H$)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ : 1.28-1.42 (2H, перекрывающийся m), 1.64-1.72 (2H, перекрывающийся m), 2.02-2.11 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.42 (2H, t), 2.69-2.78 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.56 (1H, br s), 5.62 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.16 (0.8H, s), 8.28 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.22 (1H, s). (Отсутствие 3H-предполагаемого затемнения растворителем).

Пример 13. (Z)-Метил-3-(((4-((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 2-(4-аминопиперидин-1-ил)этанол, 2 HCl (100 мг, 0,462 ммоль) в DMF (1 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 2 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт загружали в колонку SCX (2 г) в 5% AcOH в MeOH (10 мл). Колонку промывали MeOH (10 мл) и фильтрат удаляли. Продукт элюировали 1% аммиаком в MeOH (25 мл). Растворитель выпаривали при пониженном давлении и продукт очищали методом колоночной флеш-хроматографии (SiO_2 , 12 г, 0-30% MeOH в DCM, градиентное элюирование) с получением (Z)-метил-3-(((4-((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата в виде светло-желтого твердого вещества (33 мг, 34%); R^t 1,56 мин (способ 1); m/z 555 ($M+H$)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ : 1.43-1.56 (2H, перекрывающийся m), 1.65-1.74 (2H, перекрывающийся m), 2.00 (2H, t), 2.13 (3H, s), 2.36 (2H, m), 2.85 (2H, m), 3.47 (2H, m), 3.66 (1H, m), 3.75 (3H, s), 4.37 (1H, m), 5.61 (1H, s), 6.86 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.56-7.76 (5H, перекрывающийся m), 8.09 (1H, d), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s).

Пример 14. (Z)-Метил-3-(((4-((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат

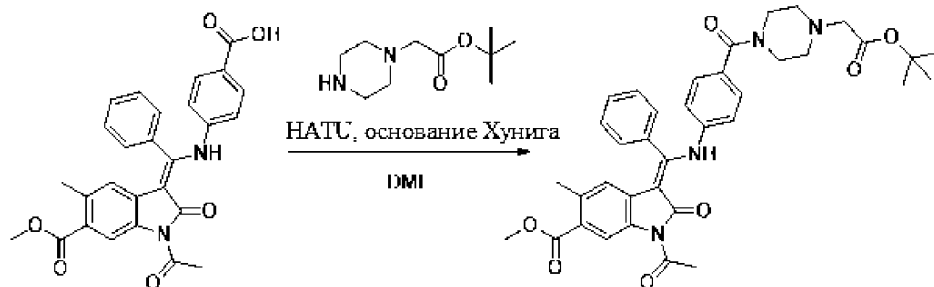


(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (75 мг, 0,128 ммоль) и HATU (73 мг, 0,192 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (179 мкл, 1,03 ммоль) и 2-(4-(аминометил)пиперидин-1-ил)этанол (73,1 мг, 0,462 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч и добавляли пиперидин (127 мкл, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт загружали в колонку SCX (2 г) в 5% AcOH в MeOH (10 мл). Колонку промывали MeOH (10 мл) и фильтрат удаляли. Затем продукт элюировали 1% аммиаком в MeOH (25 мл). Растворитель выпаривали при пониженном давлении и продукт очищали методом колоночной флеш-хроматографии (SiO_2 , 12 г, 0-30% MeOH в DCM, градиентное элюирование) с получением (Z)-метил-3-(((4-(((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата в виде светло-желтого твердого вещества (63 мг, 63%); R^1 1,56 мин (способ 1); m/z 569 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ (ES^+); ^1H ЯМР δ : 1.05-1.19 (2H, перекрывающийся m), 1.47 (1H, m), 1.58 (2H, m), 1.81-1.94 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.28-2.40 (2H, перекрывающийся m), 2.82 (2H, m), 3.07 (2H, t), 3.46 (2H, m), 3.75 (3H, s), 4.34 (1H, s), 5.61 (1H, s), 6.86 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.70 (5H, m), 8.32 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s).

Путь 1С.

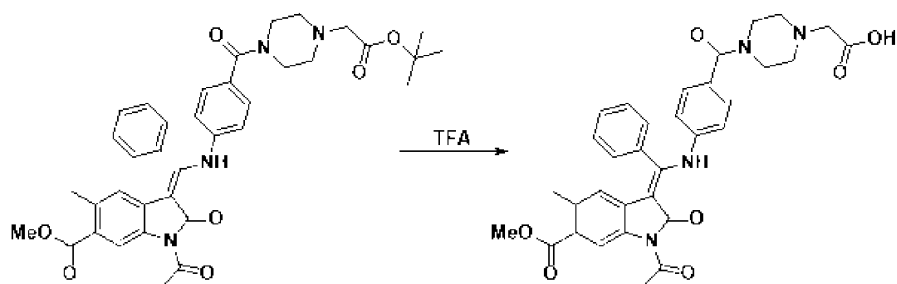
Пример 15. (Z)-Метил-3-(((4-(4-(2-((2-гидроксиэтил)амино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат.

Промежуточное соединение F. (Z)-Метил-1-ацетил-3-(((4-(4-(2-(трет-бутоксид)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



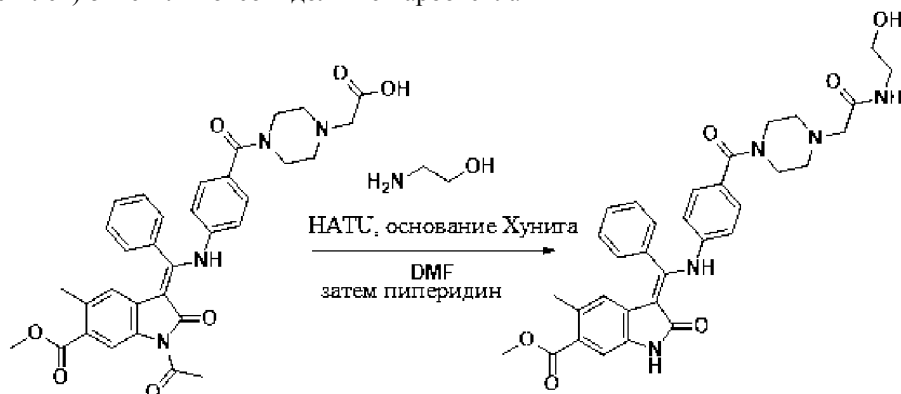
(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту, трифторуксусный аддукт (промежуточное соединение E) (500 мг, 0,855 ммоль) и HATU (488 мг, 1,28 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (448 мкл, 2,57 ммоль) и трет-бутил-2-(пиперазин-1-ил)ацетат (171 мг, 0,855 ммоль) в DMF (1 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (100 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (40 мл). Органический слой промывали соевым раствором (40 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали методом колоночной флеш-хроматографии (SiO_2 , 12 г, 0-30% 1% аммиака в MeOH в DCM, градиентное элюирование) с получением указанного соединения (Z)-метил-1-ацетил-3-(((4-(4-(2-(трет-бутоксид)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата в виде светло-желтого твердого вещества (483 мг, 83%); R^1 2,31 мин (способ 1); m/z 653 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ (ES^+); ^1H ЯМР δ : 1.40 (9H, s), 2.13 (3H, s), 2.73 (3H, s), 3.13 (2H, s), 3.17-3.30 (2H, перекрывающийся m), 3.43-3.62 (2H, перекрывающийся m), 3.77 (3H, s), 5.49 (1H, s), 7.03 (2H, m), 7.21 (2H, m), 7.50 (2H, m), 7.57-7.68 (3H, перекрывающийся m), 8.68 (1H, s), 11.88 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого затемнения растворителем).

Промежуточное соединение G. (Z)-2-(4-(4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензоил)пиперазин-1-ил)уксусная кислота



К раствору (Z)-метил-1-ацетил-3-(((4-(4-(2-(трет-бутоксид)2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата (промежуточное соединение F) (481 мг, 0,737 ммоль) в DCM (4,8 мл) добавляли TFA (568 мкл, 7,37 ммоль) и смесь перемешивали при к.т. в течение 16 ч. Добавляли другую часть TFA (1 мл, 13,0 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при к.т. еще 3 ч, после чего добавляли еще одну часть TFA (0,5 мл, 7,50 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при к.т. еще один час. Реакционную смесь по каплям добавляли к насыщенному водному раствору NaHCO_3 (50 мл). Слои разделяли и органические вещества концентрировали при пониженном давлении. Твердое вещество, образованное в водной среде, собирали фильтрацией и сушили при пониженном давлении. Оба твердых вещества объединяли с получением (Z)-2-(4-(4-(((1-ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензоил)пиперазин-1-ил)уксусной кислоты (410 мг, 89%) в виде светло-желтого твердого вещества; R^t 1,94 мин (способ 1); m/z 597 ($M+H$)⁺ (ES^+); 1H ЯМР δ : 2.13 (3H, s), 2.73 (3H, s), 3.17 (2H, s), 3.47-3.65 (2H, перекрывающийся m), 3.77 (3H, s), 5.50 (1H, s), 7.03 (2H, m), 7.22 (2H, m), 7.50 (2H, m), 7.55-7.68 (4H, перекрывающийся m), 8.68 (1H, s), 11.89 (1H, s). (Отсутствие 6H-предполагаемого затемнения растворителем).

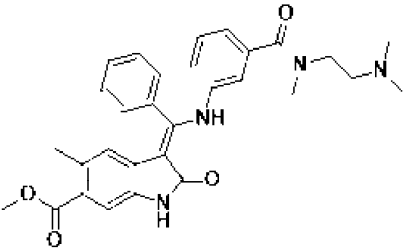
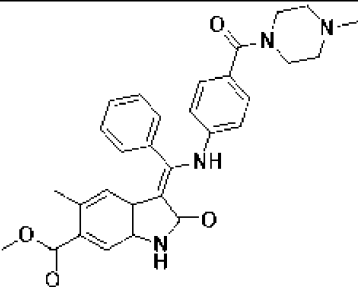
(Z)-Метил-3-(((4-(4-(2-((2-гидроксиэтил)амино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат

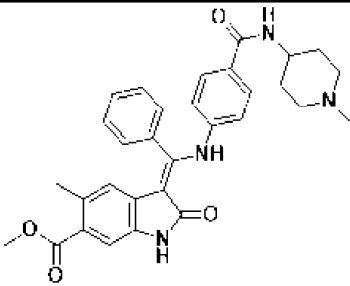
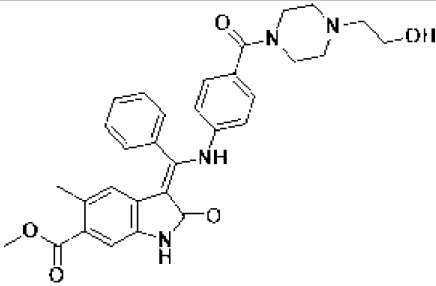


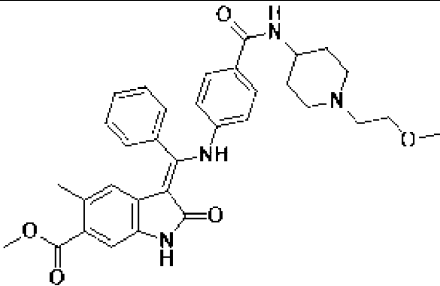
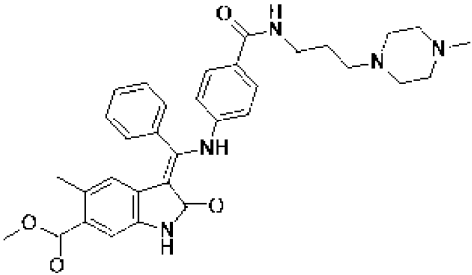
(Z)-2-(4-(4-(((1-ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензоил)пиперазин-1-ил)уксусную кислоту (промежуточное соединение G) (200 мг, 0,335 ммоль) и HATU (191 мг, 0,503 ммоль) в DMF (2 мл) перемешивали при к.т. в течение 10 мин, затем добавляли основание Хунига (176 мкл, 1,00 ммоль) и 2-аминоэтанол (22,52 мг, 0,369 ммоль) в DMF (1 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 4 ч и добавляли пиперидин (332 мкл, 3,35 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 18 ч. Реакционную смесь разделяли между DCM (25 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (10 мл). Органический слой промывали соевым раствором (10 мл) и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт загружали в картридж SCX в 5% AcOH в $\text{MeOH}:\text{MeOH}:\text{DCM}$ (2:1:1, 20 мл). Колонку промывали MeOH (30 мл) и фильтрат удаляли. Продукт элюировали 1% аммиаком в MeOH (25 мл). Растворитель выпаривали при пониженном давлении и продукт очищали методом колоночной флеш-хроматографии (SiO_2 , 12 г, 0-30% 1% аммиака в MeOH в DCM, градиентное элюирование) с получением указанного соединения (Z)-метил-3-(((4-(4-(2-((2-гидроксиэтил)амино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата (81 мг, 39%) в виде светло-желтого твердого вещества; R^t 1,57 мин (способ 1); m/z 598 ($M+H$)⁺ (ES^+); 1H ЯМР δ : 2.13 (3H, s), 2.33-2.47 (4H, перекрывающийся m), 2.93 (2H, s), 3.16 (2H, q), 3.39 (2H, q), 3.75 (3H, s), 4.68 (1H, t), 5.60 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.19 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.68 (3H, перекрывающийся m), 7.72 (1H, s), 10.85 (1H, s), 12.21 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого затемнения растворителем).

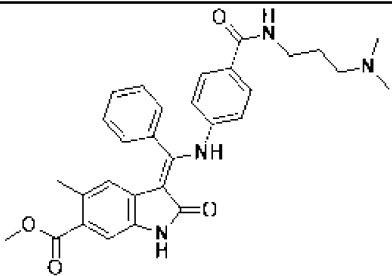
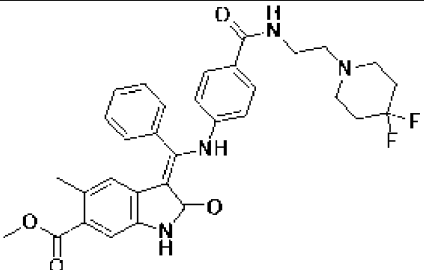
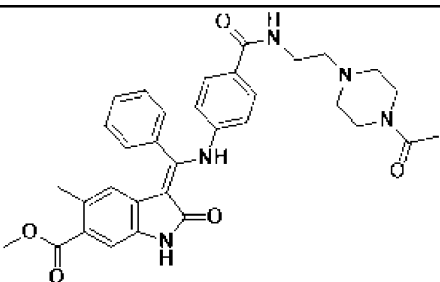
Следующие соединения примеров (табл. 2) могут быть получены способами синтеза, подобными вышеупомянутым в примерах, или способами, описанными в другом месте настоящего описания.

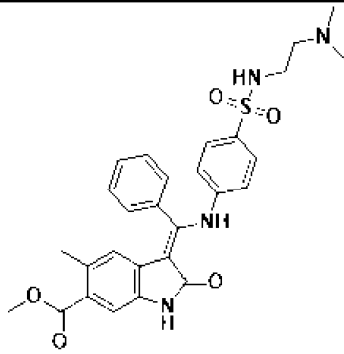
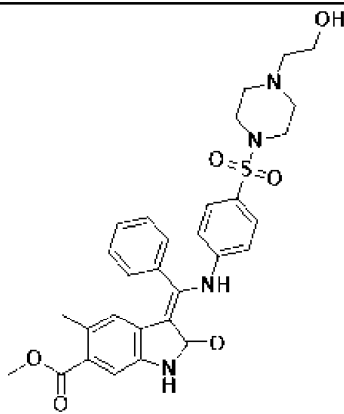
Таблица 2. Дополнительные соединения примеров изобретения

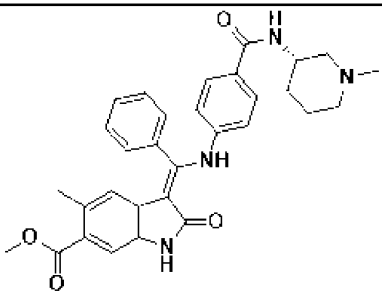
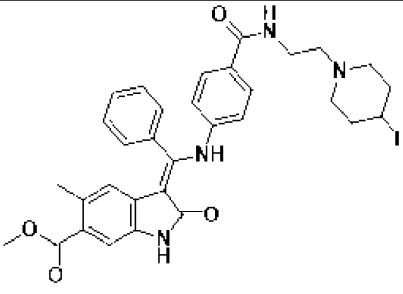
Пример 16:	
 (Z)-Метил-3-(((3-((2-(диметиламино)этил)(метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.59 мин (способ 1); m/z 513 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР (смесь ротамеров) δ: 1.89 (3H, s), 2.13 (3H, s), 2.15-2.26 (4H, перекрывающийся m), 2.34-2.44 (1H, m), 2.57 (1.5H, s), 2.87 (1.5H, s), 2.88-2.96 (1H, m), 3.39-3.49 (1H, m), 3.75 (3H, s), 5.57 (1H, s), 6.77 (0.5H, s), 6.85 (0.5H, s), 7.02 (2H, d), 7.26 (1H, t), 7.36 (1H, s), 7.49-7.51 (2H, перекрывающийся m), 7.54-7.66 (3H, перекрывающийся m), 10.83 (1H, s), 12.13 (1H, s).
Код пути*: 1B	
Пример 17:	
 (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-	R^t 1.56 мин (способ 1); m/z 511 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.16 (3H, s), 2.19-2.31 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.60 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.18 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.56-7.68 (3H, перекрывающийся m), 10.85 (1H, s), 12.21 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого

оксоиндолин-6-карбоксилат	затемнения растворителем).
Код пути*: 1B	
Пример 18:	
 (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((1-метилпиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат	R^t 1.54 мин (способ 1); m/z 525 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.60-1.75 (2H, перекрывающийся m), 1.91-2.02 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.71-2.79 (3H, перекрывающийся m), 2.98-3.13 (2H, перекрывающийся m), 3.40-3.47 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 3.94 (1H, m), 5.62 (1H, s), 6.86 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.54 (2H, m), 7.57-7.71 (5H, перекрывающийся m), 8.30 (1H, d), 9.16 (1H, s), 10.89 (1H, s), 12.24 (1H, s).
Код пути*: 1B	
Пример 19:	
 (Z)-Метил-3-(((4-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,5 формиат	R^t 1.49 мин (способ 1); m/z 541 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.14 (3H, s), 2.28-2.45 (6H, перекрывающийся m), 3.49 (3H, t), 3.76 (3H, s), 4.43 (1H, s), 5.60 (1H, s), 6.80-6.91 (2H, перекрывающийся m), 7.13-7.23 (2H, перекрывающийся m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, перекрывающийся m), 7.57-7.70 (3H, перекрывающийся m), 8.16 (0.5H, s), 10.86 (1H, s), 12.22 (1H, s). (Отсутствие 3H-предполагаемого затемнения растворителем)

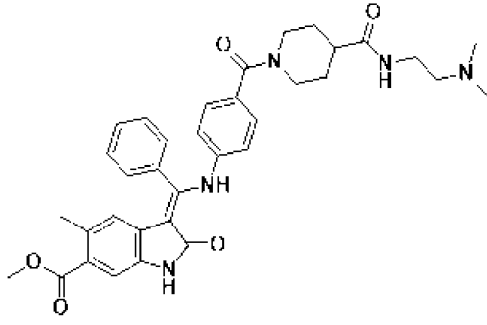
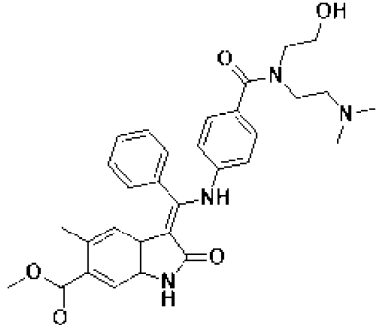
Код пути*: 1В	
Пример 20:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((1-(2-метоксизтил)пиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.58 мин (способ 1); m/z 569 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.66-1.83 (2H, перекрывающийся m), 1.89-2.03 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.99-3.14 (2H, перекрывающийся m), 3.45-3.55 (2H, перекрывающийся m), 3.65 (2H, t), 3.75 (3H, s), 3.94 (1H, m), 5.61 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.72 (5H, перекрывающийся m), 8.33 (1H, d), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 5H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 21:	
 (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат	R^t 1.40 мин (способ 1); m/z 568 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.54-1.68 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.14 (3H, s), 2.20-2.41 (8H, перекрывающийся m), 3.16-3.25 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.85 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.56-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.19 (1H, s), 8.35 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	

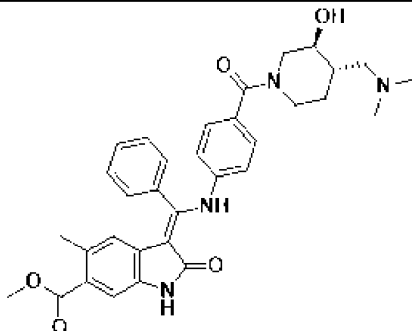
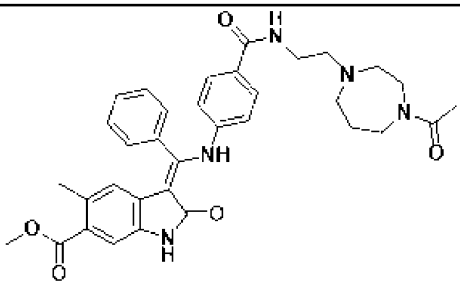
Пример 22:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((3-(диметиламино)пропил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,5 формат	R^t 1.53 мин (способ 1); m/z 513 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.65 (2H, m), 2.13 (3H, s), 2.30 (6H, s), 2.46 (2H, t), 3.22 (2H, m), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.58-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.16 (0.5H, s), 8.39 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s).
Код пути*: 1В	
Пример 23:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.65 мин (способ 1); m/z 575 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.93-2.32 (7H, перекрывающийся m), 3.40-3.57 (2H, m), 3.75 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.89 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.71 (5H, перекрывающийся m), 8.47 (1H, m), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 6H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 24:	
	R^t 1.51 мин (способ 1); m/z 582 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.05 (3H, s), 2.14 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.87-4.52 (4H, перекрывающийся m), 5.63 (1H, s), 6.92 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.54 (2H, перекрывающийся m), 7.58-7.72

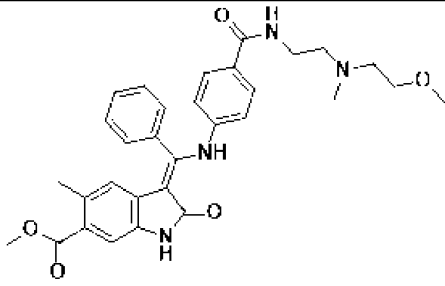
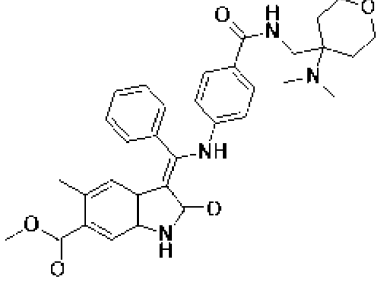
(Z)-Метил-3-(((4-((2-(4-ацетилпиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	(5H, перекрывающийся m), 8.59 (1H, t), 10.90 (1H, s), 12.24 (1H, s). (Отсутствие 8H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 25:	
 (Z)-Метил-3-(((4-(N-(2-(диметиламино)этил)сульфамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат	R^t 1.58 мин (способ 1); m/z 535 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.15 (6H, s), 2.35 (2H, t), 2.81 (2H, t), 3.76 (3H, s), 5.64 (1H, s), 6.97 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.50-7.59 (4H, перекрывающийся m), 7.60-7.71 (3H, перекрывающийся m), 8.15 (1H, s), 10.92 (1H, s), 12.24 (1H, s).
Код пути*: 1А	
Пример 26:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)сульфонил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат	R^t 1.65 мин (способ 1); m/z 577 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.14 (3H, s), 2.34 (2H, t), 2.37-2.47 (4H, перекрывающийся m), 2.73-2.82 (4H, перекрывающийся m), 3.41 (2H, t), 3.76 (3H, s), 4.38 (1H, s), 5.64 (1H, s), 6.97 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.48 (2H, m), 7.56 (2H, m), 7.60-7.72 (3H, перекрывающийся m), 8.14 (1H, s), 10.93 (1H, s), 12.28 (1H, s).

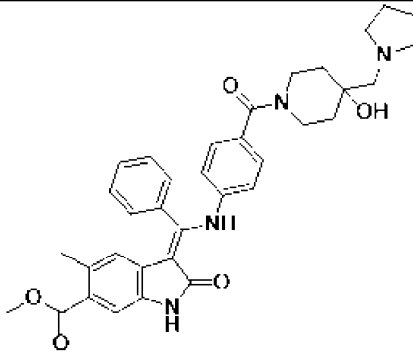
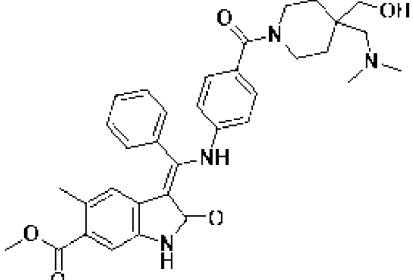
Код пути*: 1A	
Пример 27:	
 (<i>S,Z</i>)-Метил-5-метил-3-(((4-((1-метилпиперидин-3-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,5 формиат	R^t 1.56 мин (способ 1); m/z 525 ($(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.27-1.64 (3H, перекрывающийся m), 1.69-1.83 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.82-3.09 (3H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 3.95 (1H, s), 5.62 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.58-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.14 (0.5H, s), 8.17 (1H, d), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s).
Код пути*: 1B	
Пример 28:	
 (<i>Z</i>)-Метил-3-(((4-((2-(4-фторпиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат	R^t 1.60 мин (способ 1); m/z 557 ($(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.70-2.35 (4H, перекрывающийся m), 2.14 (3H, s), 3.00-3.35 (4H, перекрывающийся m), 3.46-3.65 (3H, перекрывающийся m), 3.76 (3H, s), 5.63 (1H, s), 6.91 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.58-7.73 (5H, перекрывающийся m), 8.57 (1H, br s), 9.04 (1H, br s), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого перекрытия растворителем).
Код пути*: 1B	
Пример 29:	

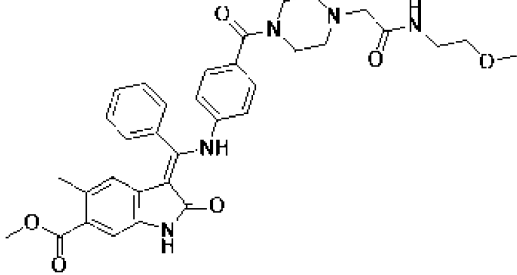
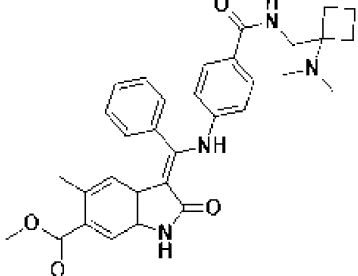
	R^t 1.55 мин (способ 1); m/z 555 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.62 (2H, m), 2.13 (3H, s), 2.23-2.40 (6H, перекрывающийся m), 3.22 (2H, m), 3.50-3.58 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.56-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.34 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s).
Код пути*: 1В	
Пример 30:	
	R^t 1.57 мин (способ 1); m/z 594 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.62-2.00 (4H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.33 (3H, s), 2.92-3.04 (2H, перекрывающийся m), 3.05-3.27 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.06 (1H, m), 5.59 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.19 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.47 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.70 (3H, перекрывающийся m), 10.85 (1H, s), 12.22 (1H, s). (Отсутствие 3H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 31:	

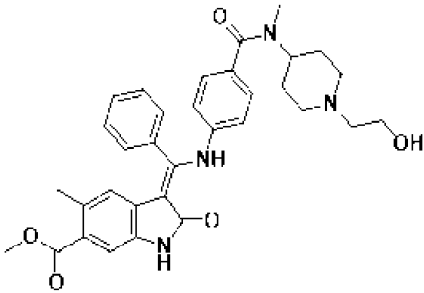
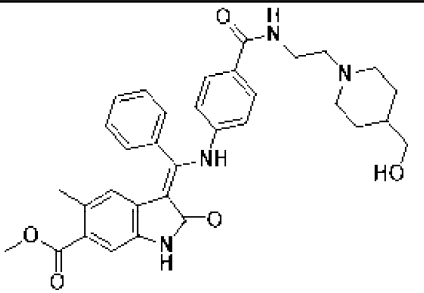
 (Z)-Метил-3-(((4-(4-((2-(диметиламино)этил)карбамоил)пиперидин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,4 формиат	R^t 1.53 мин (способ 1); m/z 610 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.36-1.52 (2H, перекрывающийся m), 1.59-1.78 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.34 (1H, m), 2.55 (6H, s), 2.70-3.02 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.60 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.18 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.56-7.70 (3H, перекрывающийся m), 7.95 (1H, d), 8.13 (0.4H, s), 10.86 (1H, s), 12.21 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1B	
Пример 32:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((2-(диметиламино)этил)(2-гидроксиэтил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,3 формиат	R^t 1.49 мин (способ 1); m/z 543 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.00-2.15 (2H, перекрывающийся m), 2.65 (3H, br s), 3.04 (2H, m), 3.21-3.46 (2H, перекрывающийся m), 3.66 (2H, m), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.23 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.47-7.67 (5H, перекрывающийся m), 8.13 (0.3H, s), 10.85 (1H, s), 12.19 (1H, s). (Отсутствие 3H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1B	
Пример 33:	

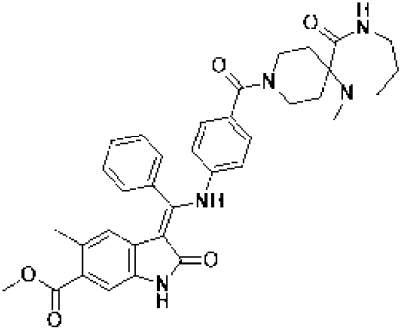
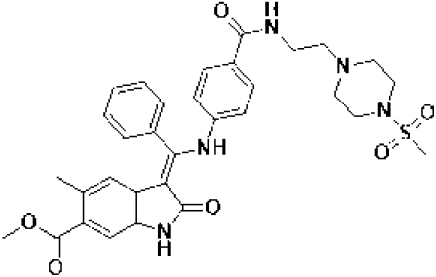
 (Z)-Метил-3-(((4-((3S,4S)-4-((диметиламино)метил)-3-гидроксипиперидин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.54 мин (способ 1); m/z 569 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.14 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.91 (1H, m), 2.13 (3H, s), 2.71-2.87 (6H, перекрывающийся m), 2.98 (2H, m), 3.19-3.29 (3H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.22-4.56 (2H, перекрывающийся m), 5.60 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.19 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.48-7.72 (5H, перекрывающийся m), 8.67 (1H, s), 10.86 (1H, s), 12.22 (1H, s).
Код пути*: 1В	
Пример 34:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((2-(4-ацетил-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.55 мин (способ 1); m/z 596 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.92-2.09 (5H, перекрывающийся m), 2.14 (3H, s), 3.52 (6H, s), 3.76 (3H, s), 5.63 (1H, s), 6.90 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.58-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.56 (1H, s), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 6H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 35:	

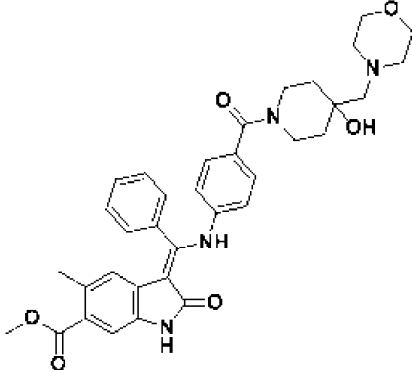
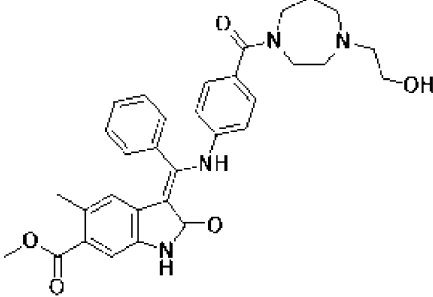
 (Z)-Метил-3-(((4-((2-((2-метоксизтил)(метил)амино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,5 формиат	R^t 1.60 мин (способ 1); m/z 543 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.38 (3H, s), 2.61-2.83 (4H, перекрывающийся m), 3.21 (3H, s), 3.45 (2H, t), 3.75 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.13 (0.5 H, s), 8.30 (1H, s), 10.88 (1H, s), 12.22 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем.)
Код пути*: 1В	
Пример 36:	
 (Z)-Метил-3-(((4-(((4-(диметиламино)тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.59 мин (способ 1); m/z 569 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.64-1.90 (4H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.62-2.86 (6H, перекрывающийся m), 3.53-3.67 (2H, перекрывающийся m), 3.76-3.89 (5H, перекрывающийся m), 5.60 (1H, s), 6.91 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.54 (2H, m), 7.59-7.71 (5H, перекрывающийся m), 8.43 (1H, m), 10.90 (1H, m), 12.25 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем.)
Код пути*: 1В	
Пример 37:	

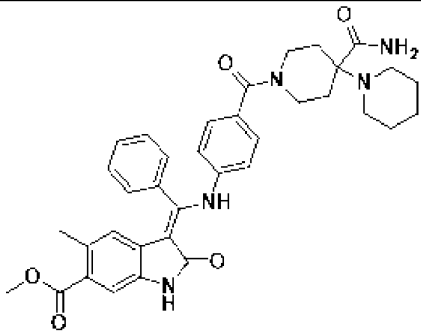
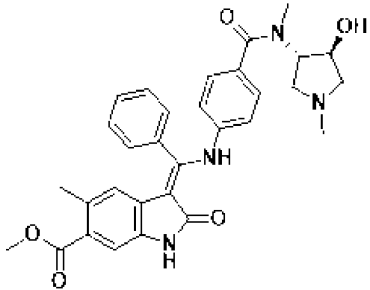
 (Z)-Метил-3-(((4-(4-гидрокси-4-(пирролидин-1-илметил)пиперидин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, формиат	R^t 1.54 мин (способ 1); m/z 595 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.14-1.69 (4H, перекрывающийся m), 1.75-1.91 (4H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.84-3.20 (8H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.11 (1H, br s), 5.60 (1H, s), 6.89 (2H, m), 7.18 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.56-7.68 (3H, перекрывающийся m), 8.13 (1H, s), 10.86 (1H, s), 12.21 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 38:	
 (Z)-Метил-3-(((4-(4-((диметиламино)метил)-4-(гидроксиметил)пиперидин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.52 мин (способ 1); m/z 583 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.36-1.60 (4H перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.82 (6H, s), 3.12 (2H, s), 3.19-3.38 (4H, перекрывающийся m), 3.56 (2H, s), 3.75 (3H, s), 5.44 (1H, br s), 5.60 (1H, s), 6.89 (2H, m), 7.19 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.57-7.73 (3H, перекрывающийся m), 10.85 (1H, s), 12.21 (1H, s).
Код пути*: 1В	
Пример 39:	

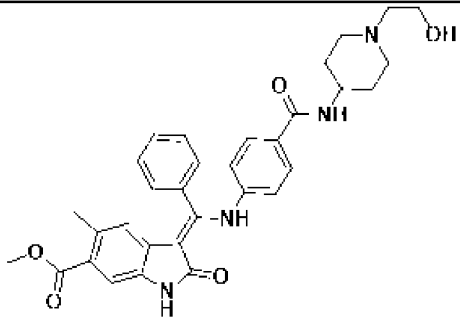
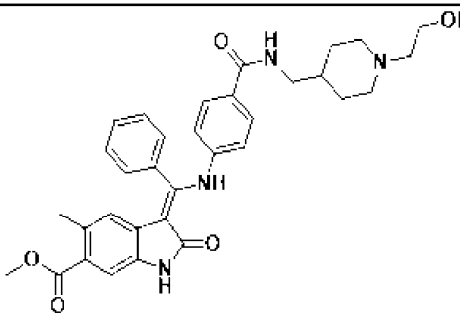
 (Z)-Метил-3-(((4-(4-(2-((2-метоксиэтил)амино)-2-оксоэтил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.61 мин (способ 1); m/z 612 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.36-2.44 (4H, перекрывающийся m), 2.93 (2H, s), 3.20-3.27 (5H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.60 (1H, s), 6.84 (2H, m), 7.20 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.50 (2H, m), 7.57-7.69 (3H, перекрывающийся m), 7.76 (1H, t), 10.85 (1H, s), 12.21 (1H, s). (Отсутствие 6H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 40:	
 (Z)-Метил-3-(((4-(((1-(диметиламино)циклобутил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,3 формиат	R^t 1.66 мин (способ 1); m/z 539 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.62-1.75 (2H, перекрывающийся m), 2.00-2.12 (4H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 3.62 (2H, d), 3.75 (3H, s), 5.60 (1H, s), 6.90 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.54 (2H, m), 7.58-7.72 (5H, перекрывающийся m), 8.14 (0.3H, s), 8.47 (1H, s), 10.89 (1H, s), 12.25 (1H, s). (Отсутствие 6H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 41:	

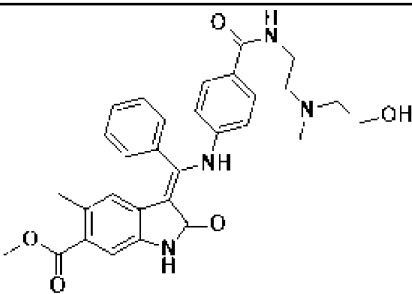
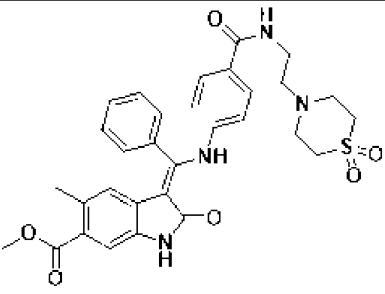
 (Z)-Метил-3-(((4-((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)(метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,2 формиат	R^t 1.58 мин (способ 1); m/z 569 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.59-1.84 (2H, перекрывающийся m), 1.89-2.08 (2H, перекрывающийся m), 2.14 (3H, s), 2.68-2.81 (3H, br s), 2.83-3.08 (2H, перекрывающийся m), 3.55-3.71 (2H, m), 3.75 (3H, s), 4.43 (1H, br s), 5.14 (1H, br s), 5.62 (1H, s), 6.89 (2H, m), 7.20 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.51 (2H, m), 7.57-7.69 (3H, перекрывающийся m), 8.13 (0.2H, s), 10.85 (1H, s), 12.19 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1B	
Пример 42:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((2-(4-гидроксиметил)пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,2 формиат	R^t 1.59 мин (способ 1); m/z 569 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.22-1.38 (2H, перекрывающийся m), 1.53 (1H, m), 1.74-1.78 (2H, перекрывающийся m), 2.14 (3H, s), 2.57-2.82 (2H, перекрывающийся m), 2.88-3.06 (2H, перекрывающийся m), 3.26 (2H, t), 3.49 (2H, m), 3.75 (3H, s), 4.58 (1H, t), 5.62 (1H, s), 6.90 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.13 (0.2H, s), 8.47 (1H, t), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем).

Код пути*: 1В	
Пример 43:	
 (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-(7-метил-12-оксо-3,7,11-триазаспиро[5.6]додекан-3-карбонил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.58 мин (способ 1); m/z 608 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.46-1.66 (2H, перекрывающийся m), 1.67-1.81 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.96-3.18 (4H, перекрывающийся m), 3.19-3.29 (3H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 3.86 (1H, br s), 5.59 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.19 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.47-7.57 (3H, перекрывающийся m), 7.57-7.72 (3H, перекрывающийся m), 10.86 (1H, s), 12.22 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 44:	
 (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.59 мин (способ 1); m/z 618 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.85 (3H, s), 3.01-3.13 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.71 (5H, перекрывающийся m), 8.29 (1H, s), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 8H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 45:	

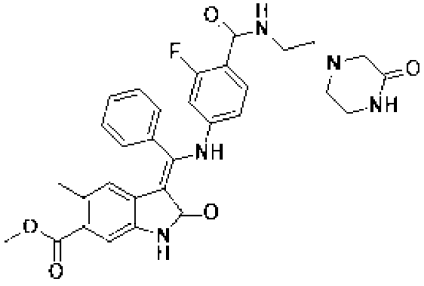
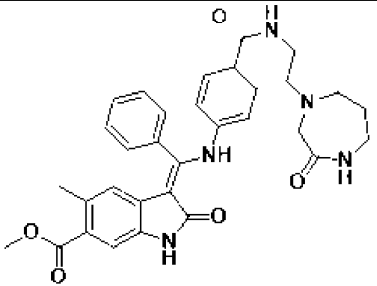
 (Z)-Метил-3-(((4-(4-гидрокси-4-(морфолинометил)пиперидин-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.53 мин (способ 1); m/z 611 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.32-1.61 (4H, перекрывающийся m), 2.14 (3H, s), 2.24 (2H, s), 3.00-3.30 (4H, перекрывающийся m), 3.50-3.56 (4H, перекрывающийся m), 3.76 (3H, s), 4.03 (1H, br s), 4.29 (1H, s), 5.60 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.18 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.56-7.73 (3H, перекрывающийся m), 10.86 (1H, s), 12.21 (1H, s). (Отсутствие 3H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1B	
Пример 46:	
 (Z)-Метил-3-(((4-(4-(2-гидроксиэтил)-1,4-дiazепан-1-карбонил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.51 мин (способ 1); m/z 555 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 1.63 (1H, m), 1.75 (1H, m), 2.13 (3H, s), 2.53-2.92 (5H, перекрывающийся m), 3.43-3.59 (7H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.36 (1H, br s), 5.60 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.17 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.68 (3H, перекрывающийся m), 10.85 (1H, s), 12.19 (1H, s).
Код пути*: 1B	
Пример 47:	

 (Z)-Метил-3-(((4-(4'-карбамоил-[1,4'-бипиперидин]-1'-карбонил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.58 мин (способ 1); m/z 622 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.31-1.41 (2H, перекрывающийся m), 1.41-1.51 (4H, перекрывающийся m), 1.56-1.90 (4H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.35-2.45 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.59 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.00 (1H, br s), 7.07 (1H, br s), 7.20 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.58-7.68 (3H, перекрывающийся m), 10.85 (1H, s), 12.21 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 48:	
 (Z)-Метил-3-(((4-(((3S,4S)-4-гидрокси-1-метилпирролидин-3-ил)(метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат, 0,4 формиат	R^t 1.52 мин (способ 1); m/z 541 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.19 (3H, br s), 2.65 (1H, m), 2.77-2.93 (4H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.22 (1H, m), 5.18 (1H, m), 5.60 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.20 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.58-7.68 (3H, перекрывающийся m), 8.14 (0.4H, s), 10.85 (1H, s), 12.22 (1H, s). (Отсутствие 3H-перекрытия растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 49:	

 (Z)-Метил-3-((((4-((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метиле́н)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.60 мин (способ 1); m/z 555 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.44-1.57 (2H, перекрывающийся m), 1.65-1.74 (2H, перекрывающийся m), 1.91-2.10 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.32-2.43 (2H, перекрывающийся m), 2.79-2.93 (2H, перекрывающийся m), 3.44-3.51 (2H, перекрывающийся m), 3.68 (1H, m), 3.75 (3H, s), 4.38 (1H, s), 5.61 (1H, s), 6.85 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.51 (2H, m), 7.56-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.10 (1H, d), 10.89 (1H, s), 12.23 (1H, s).
Код пути*: 1В	
Пример 50:	
 (Z)-Метил-3-((((4-((((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метиле́н)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.54 мин (способ 1); m/z 569 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.05-1.19 (2H, m), 1.46 (1H, m), 1.54-1.63 (2H, перекрывающийся m), 1.81-1.94 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (3H, s), 2.28-2.40 (2H, перекрывающийся m), 2.77-2.90 (2H, перекрывающийся m), 3.07 (2H, t), 3.41-3.50 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.34 (1H, br s), 5.61 (1H, s), 6.86 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.32 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s).
Код пути*: 1В	

Пример 51:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((2-((2-гидроксиэтил)(метил)амино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.51 мин (способ 1); m/z 529 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.21 (3H, s), 2.40-2.48 (2H, перекрывающийся m), 3.24-3.32 (2H, перекрывающийся m), 3.40-3.48 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 4.37 (1H, m), 5.61 (1H, s), 6.86 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.69 (5H, перекрывающийся m), 8.25 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 2H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1В	
Пример 52:	
 (Z)-Метил-3-(((4-((2-(1,1-диоксидотиоморфолино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метилен)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.90 мин (способ 1); m/z 589 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 2.14 (3H, s), 2.61 (2H, t), 2.89-2.96 (4H, перекрывающийся m), 3.01-3.11 (4H, перекрывающийся m), 3.28-3.34 (2H, перекрывающийся m), 3.76 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.58-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.29 (1H, t), 10.89 (1H, s), 12.24 (1H, s).
Код пути*: 1В	
Пример 53:	

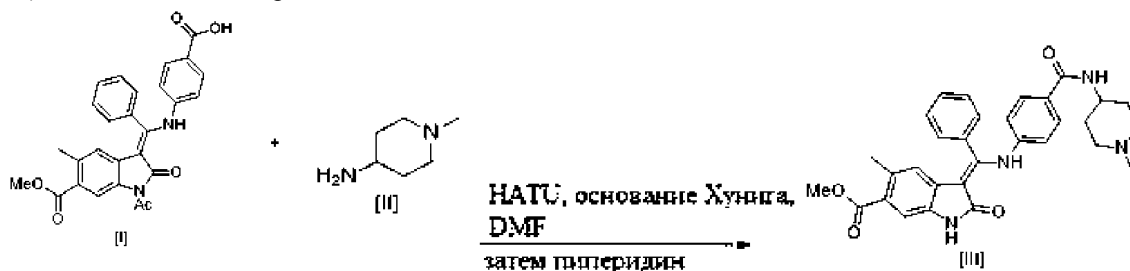
	R^t 1.57 мин (способ 1); m/z 568 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 2.14 (3H, s), 2.36-2.42 (2H, перекрывающийся m), 2.53-2.59 (6H, перекрывающийся m), 3.06-3.12 (2H, перекрывающийся m), 3.27-3.34 (2H, перекрывающийся m), 3.76 (3H, s), 5.62 (1H, s), 6.88 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.50-7.56 (3H, перекрывающийся m), 7.58-7.71 (5H, перекрывающийся m), 8.29 (1H, t), 10.90 (1H, s), 12.24 (1H, s).
(Z)-Метил-5-метил-2-оксо-3-(((4-((2-(5-оксо-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)индолин-6-карбоксилат	
Код пути*: 1В	
Пример 54:	
	R^t 1.61 мин (способ 1); m/z 556 $(M+H)^+$ (ES^+); 1H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.21 (3H, s), 2.92 (2H, s), 3.30 (2H, m), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.56-7.71 (6H, перекрывающийся m), 8.35 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.22 (1H, s). (Отсутствие 5H-предполагаемого затемнения растворителем).
(Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((2-(метил(2-(метиламино)-2-оксоэтил)амино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	
Код пути*: 1В	
Пример 55:	

 (Z)-Метил-3-(((3-фтор-4-((2-(3-оксопиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилат	R^t 1.64 мин (способ 1); m/z 572 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.54-2.60 (2H, перекрывающийся m), 2.95 (2H, br s), 3.06-3.15 (2H, перекрывающийся m), 3.76 (3H, s), 5.64 (1H, s), 6.58 (1H, dd), 6.77 (1H, dd), 7.36 (1H, s), 7.45 (1H, t), 7.55 (2H, m), 7.59-7.76 (4H, перекрывающийся m), 8.07 (1H, s), 10.91 (1H, s), 12.16 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1B	
Пример 56:	
 (Z)-Метил-5-метил-2-оксо-3-(((4-((2-(3-оксо-1,4-дизаепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-индолин-6-карбоксилат	R^t 1.55 мин (способ 1); m/z 568 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 2.13 (3H, s), 2.35-2.41 (2H, перекрывающийся m), 3.03-3.11 (2H, перекрывающийся m), 3.17 (2H, d), 3.26-3.33 (2H, перекрывающийся m), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.87 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.47-7.56 (3H, перекрывающийся m), 7.55-7.70 (5H, перекрывающийся m), 8.27 (1H, t), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s). (Отсутствие 4H-предполагаемого затемнения растворителем).
Код пути*: 1B	

*Индекс кода пути: путь 1A: см. пример 1; путь 1B: см. примеры 2-14; путь 1C: см. пример 15.

Дополнительный способ синтеза для примера 18.

Пример 18. (Z)-Метил-5-метил-3-(((4-((1-метилпиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилат



(Z)-4-(((1-Ацетил-6-(метоксикарбонил)-5-метил-2-оксоиндолин-3-илиден)(фенил)метил)амино)бензойную кислоту (промежуточное соединение E) (10 г, 17,54 ммоль) и HATU (10,01 г, 26,3 ммоль) перемешивали при к.т. в течение 10 мин в DMF (200 мл), затем добавляли основание Хунига (18,38 мл, 105

ммоль) и 1-метилпиперидин-4-амин (2,204 г, 19,30 ммоль) в DMF (10 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч. Затем добавляли пиперидин (17,37 мл, 175 ммоль) и полученную смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч. Реакционную смесь разделяли между 10% MeOH в DCM (750 мл) и насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (500 мл). Органический слой промывали соевым раствором (300 мл) и растворитель концентрировали. Полученное твердое вещество растирали в порошок с CH₃CN, фильтровали и сушили с получением 7 г неочищенного продукта.

Реакцию повторяли в идентичном масштабе и неочищенные продукты объединяли и растворяли в 10% MeOH (1% аммиака) в DCM и загружали в колонку с диоксидом кремния (300 г). Продукт элюировали 30% MeOH (1% NH₃) в растворе DCM и продукт, содержащий фракции, собирали и затем растворитель выпаривали. Вещество повторно растворяли в 30% MeOH (1% NH₃) в растворе DCM (500 мл) и промывали водой (200 мл). Органический слой сушили над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали.

Вещество сушили при пониженном давлении при 40°C всю ночь с получением (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((1-метилпиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбок-силата 1478-45-2 (12,8 г, 23,91 ммоль, 68,1% выход).

Продукт анализировали методом LCMS (Agilent, X-Select, Waters X-Select C18, 2,5 мкм, 4,6 × 30 мм, кислотный способ (0,1% муравьиной кислоты) 4 мин, 5-95% MeCN/вода): 1478-45-2-Fin, m/z 525(M+H)⁺ (ES⁺); при 1,57 мин 98% чистоты при 254 нм.

¹H ЯМР δ: R¹ 1,57 мин (способ 1); m/z 525 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1.44-1.57 (2H, перекрывающийся m), 1.65-1.72 (2H, перекрывающийся m), 1.85-1.93 (2H, перекрывающийся m), 2.13 (6H, s), 2.70-2.76 (2H, перекрывающийся m), 3.64 (1H, m), 3.75 (3H, s), 5.61 (1H, s), 6.86 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.52 (2H, m), 7.57-7.68 (5H, перекрывающийся m), 8.09 (1H, d), 10.88 (1H, s), 12.23 (1H, s).

Биологическое тестирование: экспериментальные способы.

Анализ ингибирования ферментов.

Ингибиторные активности в отношении ферментов соединений, раскрываемых в настоящем документе, определяли с использованием анализа ADP-Glo™ (Promega, UK). Анализ для FGFR1, PDGFRα, PDGFRβ и VEGFR2 выполняли в буфере, содержащем 40 mM Tris, pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 0,1 мг/мл BSA и 1 mM DTT; тогда как анализы для FGFR3 и VEGFR1 выполняли в вышеупомянутом буфере, дополненном 2 mM MnCl₂.

Ингибирование фермента FGFR1.

Ингибиторные активности соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении FGFR1 (FGFR1 Kinase Enzyme System: Promega) оценивали путем смешивания белка FGFR1 (3,12 нг/мл, 2 мкл), субстрата (Poly (4:1 Glu₄, Tyr₁), 100 нг/мл, 2 мкл) с тестируемым соединением (2 мкл либо при 3, 0,67, 0,15, 0,033, 0,0073, 0,0016, 0,0036, либо при 0,00008 мкМ) в течение 90 мин при 25°C. Затем инициировали киназную реакцию путем добавления АТФ (50 мкМ, 2 мкл) и смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Добавляли реагент ADP-Glo™ в течение 40 мин (8 мкл), затем добавляли проявляющий реагент (16 мкл) в течение 40 мин перед выявлением на устройстве для считывания микропланшетов (EnVision® Multilabel Reader, Perkin Elmer).

Ингибирование фермента FGFR3.

Ингибиторные активности соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении FGFR3 (FGFR3 Kinase Enzyme System: Promega) оценивали путем смешивания белка FGFR3 (12,5 нг/мл, 2 мкл), субстрата (Poly (Ala₆, Glu₂, Lys₅, Tyr₁), 100 нг/мл, 2 мкл) с тестируемым соединением (2 мкл либо при 3, 0,67, 0,15, 0,033, 0,0073, 0,0016, 0,0036, либо при 0,00008 мкМ) в течение 90 мин при 25°C. Затем инициировали киназную реакцию путем добавления АТФ (50 мкМ, 2 мкл) и смесь инкубировали в течение 90 мин при 25°C. Добавляли реагент ADP-Glo™ в течение 40 мин (8 мкл), затем добавляли проявляющий реагент (16 мкл) в течение 40 мин перед выявлением на устройстве для считывания микропланшетов (EnVision® Multilabel Reader, Perkin Elmer).

Ингибирование фермента PDGFRα.

Ингибиторные активности соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении PDGFRα (PDGFRα Kinase Enzyme System: Promega) оценивали путем смешивания белка PDGFRα (12,5 нг/мл, 2 мкл), субстрата (Poly (4:1 Glu₄, Tyr₁), 100 нг/мл, 2 мкл) с тестируемым соединением (2 мкл либо при 3, 0,67, 0,15, 0,033, 0,0073, 0,0016, 0,0036, либо при 0,00008 мкМ) в течение 90 мин при 25°C. Затем инициировали киназную реакцию путем добавления АТФ (25 мкМ, 2 мкл) и смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Добавляли реагент ADP-Glo™ в течение 40 мин (8 мкл), затем добавляли проявляющий реагент (16 мкл) в течение 40 мин перед выявлением на устройстве для считывания микропланшетов (EnVision® Multilabel Reader, Perkin Elmer).

Ингибирование фермента PDGFRβ.

Ингибиторные активности соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении PDGFRβ (PDGFRβ Kinase Enzyme System: Promega) оценивали путем смешивания белка PDGFRβ (6,25 нг/мл, 2 мкл), субстрата (Poly (4:1 Glu₄, Tyr₁), 100 нг/мл, 2 мкл) с тестируемым соединением (2 мкл либо при 3, 0,67, 0,15, 0,033, 0,0073, 0,0016, 0,0036, либо при 0,00008 мкМ) в течение 90 мин при 25°C. Затем

инициировали киназную реакцию путем добавления АТФ (25 мкМ, 2 мкл) и смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Добавляли реагент ADP-Glo™ в течение 40 мин (8 мкл), затем добавляли проявляющий реагент (16 мкл) в течение 40 мин перед выявлением на устройстве для считывания микропланшетов (EnVision® Multilabel Reader, Perkin Elmer).

Ингибирование фермента VEGFR1.

Ингибиторные активности соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении VEGFR1 (VEGFR1 Kinase Enzyme System: Promega) оценивали путем смешивания белка VEGFR1 (12,5 нг/мл, 2 мкл), субстрата (IGFR1tide, 100 нг/мл, 2 мкл) с тестируемым соединением (2 мкл либо при 3, 0,67, 0,15, 0,033, 0,0073, 0,0016, 0,0036, либо при 0,00008 мкМ) в течение 90 мин при 25°C. Затем инициировали киназную реакцию путем добавления АТФ (50 мкМ, 2 мкл) и смесь инкубировали в течение 90 мин при 25°C. Добавляли реагент ADP-Glo™ в течение 40 мин (8 мкл), затем добавляли проявляющий реагент (16 мкл) в течение 40 мин перед выявлением на устройстве для считывания микропланшетов (EnVision® Multilabel Reader, Perkin Elmer).

Ингибирование фермента VEGFR2.

Ингибиторные активности соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении VEGFR2 (VEGFR2 Kinase Enzyme System: Promega) оценивали путем смешивания белка VEGFR2 (1,56 нг/мл, 2 мкл), субстрата (Poly (4:1 Glu₄, Tyr₁), 100 нг/мл, 2 мкл) с тестируемым соединением (2 мкл либо при 3, 0,67, 0,15, 0,033, 0,0073, 0,0016, 0,0036, либо при 0,00008 мкМ) в течение 90 мин при 25°C. Затем инициировали киназную реакцию путем добавления АТФ (50 мкМ, 2 мкл) и смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Добавляли реагент ADP-Glo™ в течение 40 мин (8 мкл), затем добавляли проявляющий реагент (16 мкл) в течение 40 мин перед выявлением на устройстве для считывания микропланшетов (EnVision® Multilabel Reader, Perkin Elmer).

Во всех случаях киназа превращает АТФ в АДФ, а затем реагент ADP-Glo™ истощает любую оставшуюся АТФ. Реагент для выявления превращает АДФ, которая была получена, обратно в АТФ и создает люциферазу, которая может быть выявлена по люминесценции. Поэтому люминесцентный сигнал прямо пропорционален количеству АДФ, полученной путем ферментативной реакции, и снижение этого сигнала после обработки соединением демонстрирует ингибирование. Процент ингибирования, полученного с помощью каждой концентрации соединения, вычисляли с использованием представленного ниже уравнения:

$$\% \text{ ингибирования} = 1 - \frac{(\text{Среднее}_{\text{мин.}} - \text{Среднее}_{\text{н.к.г.}})}{(\text{Среднее}_{\text{мин.}} - \text{Среднее}_{\text{макс.}})} \times 100.$$

Затем процент ингибирования наносили на график в зависимости от концентрации соединения и определяли относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC₅₀) по полученной в результате кривой концентрация-ответ. После ее определения вычисляли Ki с использованием представленного ниже уравнения:

$$Ki = \frac{RIC_{50}}{1 + \left(\frac{[S]}{K_m}\right)}.$$

Клеточные и другие in vitro анализы.

Индукцированная PDGF-BB пролиферация нормальных фибробластов легкого человека (NHLF).

NHLF (Lonza group Ltd) размножали до 90% конfluence в ростовой среде FGM-2, дополненной 2% FBS (плюс факторы роста SingleQuot™; Lonza). Фибробласты собирали (трипсин/EDTA), суспендировали при 25×10³ на мл в ростовой среде и добавляли по 200 мкл на лунку (5×10³ клеток/лунка) 96-луночного планшета для культуры тканей. После 24 ч инкубации (37°C/5% CO₂/95% O₂) клетки подвергали сывороточному голоданию (24 ч) путем снижения концентрации FBS до 0,1% в культуральной среде. Клетки предварительно инкубировали с тестируемым соединением в течение 1 ч, затем стимулировали с помощью rhuPDGF-BB (100 нг/мл, R&D Systems) в течение 48 ч. Пролиферацию клеток оценивали путем включения BrdU (Cell Proliferation colorimetric ELISA, Roche). Процентное ингибирование индуцированной rhuPDGF-BB пролиферации NHLF тестируемым соединением при каждой концентрации вычисляли как процентное отношение таковой, достигнутой с помощью rhuPDGF-BB, при каждой концентрации тестируемого соединения по сравнению с контролем - средой-носителем (базальная пролиферация). Относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC₅₀) определяли по полученной в результате кривой концентрация-ответ.

Индукцированная PDGF-BB/FGF-Basic пролиферация фибробластов легкого человеческого плода MRC-5.

Фибробласты MRC-5 (LGC Standards) размножали до 90% конfluence в среде DMEM, дополненной 10% FBS. Клетки собирали (трипсин/EDTA), суспендировали при 25×10³ на мл в ростовой среде и добавляли по 200 мкл на лунку (5×10³ клеток/лунка) 96-луночного планшета для культуры тканей. После 24 ч инкубации (37°C/5% CO₂/95% O₂) клетки подвергали сывороточному голоданию (3 ч) путем замещения ростовой среды средой, содержащей 0,1% FBS. Затем клетки предварительно инкубировали с тестируемым соединением в течение 1 ч с последующей стимуляцией с помощью rhuPDGF-BB (100

нг/мл, R&D Systems) или rhuFGF-Basic (5 нг/мл; R&D Systems) в течение 48 ч. Пролиферацию клеток оценивали путем включения BrdU (Cell Proliferation Colorimetric ELISA, Roche). Процентное ингибирование индуцированной rhuPDGF-BB/rhuFGF пролиферации MRC-5 тестируемым соединением при каждой концентрации вычисляли как процентное отношение таковой, достигнутой с помощью rhuPDGF-BB/FGF-Basic, при каждой концентрации тестируемого соединения по сравнению с контролем - средой-носителем (базальная пролиферация). Относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC₅₀) определяли по полученной в результате кривой концентрация-ответ.

Индуцированная VEGF₁₆₅/FGF-Basic пролиферация эндотелиальных клеток.

TeloHAEC (иммортиализованные теломеразой эндотелиальные клетки аорты человека; ATCC) высевали в 96-луночные планшеты для культуры тканей при плотности клеток 4000 клеток на лунку (100 мкл) на минимальной среде для эндотелиальных клеток (0,5% FBS, без факторов роста FGF и VEGF) и культивировали в течение 3 ч (37°C/5% CO₂/95% O₂). Клетки предварительно инкубировали с тестируемым соединением в течение 1 ч, затем стимулировали с помощью rhuVEGF₁₆₅ (10 нг/мл, R&D Systems) или rhuFGF-Basic (5 нг/мл, R&D Systems) в течение 48 ч. Пролиферацию клеток оценивали путем включения BrdU (Cell Proliferation colorimetric ELISA, Roche). Процентное ингибирование индуцированной rhuVEGF₁₆₅/rhuFGF-Basic пролиферации TeloHAEC тестируемым соединением при каждой концентрации вычисляли как процентное отношение таковой, достигнутой с помощью rhuVEGF₁₆₅/FGF-Basic, при каждой концентрации тестируемого соединения по сравнению с контролем - средой-носителем (базальная пролиферация). Относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC₅₀) определяли по полученной в результате кривой концентрация-ответ.

Индуцированное PDGF-BB фосфорилирование PDGFRβ в фибробластах.

Использовали MRC-5/NHLF/NIH-3T3 (фибробласты эмбриона мыши, LGC Standards) для оценивания ингибиторного эффекта тестируемого соединения в отношении фосфорилирования PDGFRβ с использованием набора для клеточного анализа (Cisbio) фосфо-PDGFRβ (Tyr751) с использованием HTRF (гомогенной флуоресценции с временным разрешением). MRC-5/NHLF высевали в 96-луночные планшеты для культуры тканей при плотности клеток 10000 клеток на лунку в ростовую среду DMEM (10% FBS) или ростовую среду FGM-2 (2% FBS), соответственно, и культивировали в течение 48 ч (37°C/5% CO₂/95% O₂). NIH-3T3 высевали в 96-луночные планшеты для культуры тканей при плотности клеток 7000 клеток на лунку в ростовую среду DMEM (10% FBS) и культивировали в течение 48 ч (37°C/5% CO₂/95% O₂). Клеточную среду заменяли на соответствующую минимальную среду, содержащую 0,1% FBS, и планшеты далее инкубировали в течение 24 ч (37°C/5% CO₂/95% O₂) для MRC-5/NHLF и в течение 3 ч для NIH-3T3. Клетки предварительно инкубировали с тестируемым соединением в течение 1 ч, а затем стимулировали с помощью rhuPDGF-BB (25-50 нг/мл, R&D Systems) в течение 5 мин и с помощью gmPDGF-BB (25 нг/мл, Life Technologies) для NIH-3T3. Среду отсасывали и клетки сразу же лизировали путем добавления 50 мкл буфера для лизиса, представленного в наборе для анализа, с использованием HTRF. Переносили 16 мкл клеточного лизата из каждой лунки в белый мелкообъемный 384-луночный планшет, в который добавляли соответствующие реагенты из набора согласно инструкциям в наборе. Количественно определяли фосфорилирование PDGFRβ путем вычисления отношения флуоресценции, считываемой при 665 и 620 нм. Процентное ингибирование индуцированного rPDGF-BB фосфорилирования PDGFRβ тестируемым соединением вычисляли как процентное отношение такового, достигнутого с помощью rPDGF-BB, при каждой концентрации тестируемого соединения по сравнению с контролем - средой-носителем. Относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC₅₀) определяли по полученной в результате кривой концентрация-ответ.

Индуцированное VEGF₁₆₅ фосфорилирование VEGFR2 в эндотелиальных клетках.

TeloHAEC (иммортиализованные теломеразой эндотелиальные клетки аорты человека; ATCC) использовали для оценивания ингибиторного эффекта тестируемого соединения в отношении фосфорилирования VEGFR2 с использованием набора для клеточного анализа (Cisbio) фосфо-VEGFR2 (Tyr1175) с использованием HTRF (гомогенной флуоресценции с временным разрешением). TeloHAEC высевали в 96-луночные планшеты для культуры тканей при плотности клеток 12000 клеток на лунку в среду для роста эндотелия (ATCC; 2% FBS) и культивировали в течение 48 ч (37°C/5% CO₂/95% O₂). Клеточную среду заменяли на минимальную среду (без факторов роста VEGF и FGF), содержащую 0,5% FBS, и планшеты далее инкубировали в течение 24 ч (37°C/5% CO₂/95% O₂). Клетки предварительно инкубировали с тестируемым соединением в течение 1 ч с последующей стимуляцией с помощью rhuVEGF₁₆₅ (50 нг/мл, R&D Systems) в течение 5 мин. Среду отсасывали и клетки сразу же лизировали путем добавления 50 мкл буфера для лизиса, представленного в наборе для анализа с использованием HTRF. Переносили 16 мкл клеточного лизата из каждой лунки в белый мелкообъемный 384-луночный планшет, в который добавляли соответствующие реагенты из набора согласно инструкциям в наборе. Количественно определяли фосфорилирование VEGFR2 путем вычисления отношения флуоресценции, считываемой при 665 и 620 нм. Процентное ингибирование индуцированного rhuVEGF₁₆₅ фосфорилирования VEGFR2 тестируемым соединением вычисляли как процентное отношение такового, достигнутого с помощью rhuVEGF₁₆₅, при каждой концентрации тестируемого соединения по сравнению с контролем - средой-

носителем. Относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC_{50}) определяли по полученной в результате кривой концентрация-ответ.

Анализ по индуцированному фибробластами сокращению геля.

NHLF размножали до 90% конfluenceности в ростовой среде FGM-2 (Lonza), дополненной 2% FBS (плюс факторы роста SingleQuot™). Фибробласты собирали (трипсин/EDTA) и суспендировали при 1×10^6 на мл в бессывороточной среде. На основе набора для анализа по индуцированному клетками сокращению (Cell Biolabs) получали клеточный каркас путем смешивания 1 части клеточной суспензии с 4 частями раствора коллагенового геля согласно инструкциям в наборе. Добавляли 0,9-мл аликвоты в 1,5-мл центрифужные пробирки и обрабатывали конечными аналитическими концентрациями тестируемого соединения. Затем обработанный 250 мкл соединения каркас пипеткой добавляли в каждую лунку 48-луночного планшета для культуры тканей (три повторности на тестируемую концентрацию). Планшет инкубировали в течение 90 мин ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$) для обеспечения полимеризации геля. Затем добавляли 250 мкл бессывороточной среды, содержащей конечные аналитические концентрации тестируемого соединения, в каждый соответствующий гель. После дополнительных 30 мин инкубации гели стимулировали с помощью TGF β 1 (10 нг/мл; R&D Systems). После 24-часового ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$) периода инкубации каждый отдельный гель извлекали и взвешивали на прецизионных весах. Эффект тестируемого соединения при каждой концентрации выражали в проценте обращения индуцированного TGF β 1 сокращения относительно базального сокращения при обработке средой-носителем.

Анализ по опосредованному фибробластами высвобождению IL-6.

NHLF размножали до 90% конfluenceности в ростовой среде FGM-2 (Lonza), дополненной 2% FBS (плюс факторы роста SingleQuot™). Фибробласты собирали (трипсин/EDTA), суспендировали при 50×10^3 на мл в ростовой среде и добавляли по 200 мкл на лунку (10×10^3 клеток/лунка) 96-луночного планшета для культуры тканей. После 24 ч инкубации ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$) клетки подвергали сывороточному голоданию (24 часа) путем снижения концентрации FBS в среде до 0,1%. Клетки предварительно инкубировали с тестируемым соединением в течение 1 ч, затем стимулировали с помощью TGF β 1 (5 нг/мл, R&D Systems) в течение 24 ч. Извлекали бесклеточные супернатанты для определения концентраций IL-6 с помощью сэндвич-анализа ELISA (Duo-set, R&D Systems). Ингибирование продуцирования IL-6 вычисляли как процент, который обеспечивали с помощью 5 нг/мл TGF β 1, при каждой концентрации тестируемого соединения по сравнению с контролем - средой-носителем. Относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC_{50}) определяли по полученной в результате кривой концентрация-ответ.

Апоптоз тучных клеток.

Тучные клетки дифференцировали из CD34+ клеток кордовой крови (Lonza) в течение 8 недель в ростовой среде, дополненной 100 нг/мл SCF и 10 нг/мл IL-6. Тучные клетки высевали в 384-луночные белые планшеты с прозрачным дном от 2500 до 10000 клеток/лунка в ростовой среде, содержащей SCF (100 нг/мл). В качестве положительного контроля для апоптоза инкубировали 8 лунок в ростовой среде без SCF. Клетки инкубировали с тестируемыми соединениями или средой-носителем в течение 24 ч ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$). В клетки добавляли люминогенный субстрат каспазы-3/7 (Caspase-Glo 3/7 Assay, Promega) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед считыванием люминесцентного сигнала. Индуцирование апоптоза тестируемыми соединениями вычисляли как процентное отношение такового, достигнутого с помощью клеток, инкубированных при отсутствии SCF (максимальный апоптический ответ), для каждой концентрации тестируемого соединения по сравнению со средой-носителем (исходный апоптоз). Относительную ингибиторную концентрацию на 50% (RIC_{50}) определяли по полученной в результате кривой концентрация-ответ.

Эффект тестируемых соединений в отношении жизнеспособности клеток.

Клетки MRC-5 высевали в 96-луночные планшеты для культуры тканей с белым прозрачным дном (для считываний флуоресценции/люминесценции) или прозрачные (для колориметрических считываний) при плотности клеток 12×10^3 клеток на лунку в ростовую среду DMEM (10% FBS). После 24 ч инкубации ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$) ростовую среду заменяли содержащей 0,1% FBS плюс тестируемое соединение средой/средой-носителем и инкубировали еще 48 ч. Для колориметрического анализа MTT (по оцениванию клеточной метаболической активности) отсасывали супернатанты из каждой лунки, заменяли свежей средой по 100 мкл/лунка (0,1% FBS) и 10 мкл/лунка 5 мг/мл MTT. После 1-часового периода инкубации ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$) среду отсасывали и добавляли 100% DMSO (100 мкл) в каждую лунку. Планшеты слегка встряхивали в течение 15 мин перед считыванием поглощения при 550 нм. Процент потери жизнеспособности клеток (представленный уменьшением значений поглощения) вычисляли для каждой концентрации соединения относительно обработанных средой-носителем (0,5% DMSO) клеток.

Использовали анализ MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity в сочетании с анализом Caspase-Glo 3/7 (Promega) для измерения клеточной цитотоксичности/жизнеспособности и апоптоза. Анализ MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity представляет собой анализ флуоресценции с добавлением единственного реагента, при котором одновременно измеряют относительное число живых и мертвых клеток в клеточных популяциях. Анализ дает логометрические, находящиеся в обратной зависимости величины клеточной

жизнеспособности и цитотоксичности. Отношение жизнеспособных клеток к мертвым клеткам не зависит от числа клеток и, поэтому, может быть использовано для нормализации данных. Добавление единственного реагента Caspase-Glo® 3/7 в формате "добавить-перемешать-измерить" ("add-mix-measure") приводит к лизису клеток с последующим расщеплением каспазой субстрата и генерацией люминесцентного сигнала типа свечения ("glow-type"). Для данного анализа Multiplex Cytotoxicity 100 мкл клеточных супернатантов из обрабатываемых соединением в течение 48 ч клеток осторожно удаляли из каждой лунки, затем добавляли 50 мкл реагента MultiTox (рабочий раствор реагентов MultiTox собственного изготовления получали путем разбавления 10 мкл GF-AFC и bis-AAF-R110 в 10 мл аналитического буфера согласно инструкциям в наборе). Клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин перед выполнением двух отдельных считываний флуоресценции при 400_{Ex}/505_{Em} (считывание живых клеток) и 485_{Ex}/520_{Em} (считывание мертвых клеток). Затем по 100 мкл супернатанта осторожно удаляли из каждой лунки, добавляли 50 мкл реагента Caspase 3/7 Glo в планшет для клеточной культуры и инкубировали в течение 30 мин в темноте. Определяли количественно активность Caspase 3/7 путем считывания люминесцентного сигнала. Усиление сигнала по сравнению с обработанными средой-носителем контрольными клетками представляет усиление апоптоза клеток.

Анализ перехода фибробластов в миофибробласты.

Для оценивания протифиброзной активности тестируемых соединений использовали два альтернативных протокола. Согласно первому выделенные фибробласты легкого высевали в 96-луночные планшеты при 3000 клеток/лунка. Через 5 дней после посева клеточную среду обновляли и в клетки добавляли тестируемые соединения или среду-носитель. Через 1 ч добавляли TGF-β1 (1,25 нг/мл) для индуцирования перехода фибробластов в миофибробласты. Экспрессию αSMA, маркера перехода в миофибробласты, измеряли через 72 ч с помощью иммуноокрашивания, оцениваемого по высокоинформационной визуализации на IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare), и определяли количественно с использованием алгоритма собственной разработки (BioFocus) с программным обеспечением разработчика IN Cell (GE Healthcare). Данные алгоритма представляют интенсивность окрашивания, умноженную на окрашенную область (уровни D × A). Выполняли совместное окрашивание клеточных ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) для определения числа клеток, как меры потенциальной токсичности, и/или для нормализации αSMA по различиям в плотности клеток.

Согласно альтернативному протоколу выделенные фибробласты легкого высевали в 96-луночные планшеты при 5100 клеток/лунка. Через 24 ч клетки обновляли голодной средой еще на 24 ч. В клетки добавляли тестируемые соединения или среду-носитель. Через 1 ч добавляли TGF-β1 (0,1 нг/мл) для индуцирования перехода фибробластов в миофибробласты. Экспрессию αSMA, маркера перехода в миофибробласты, измеряли через 48 ч с помощью иммуноокрашивания, оцениваемого по высокоинформационной визуализации на ImageXpress Micro (Molecular Devices) и определяли количественно с использованием программного обеспечения MetaXpress (Molecular Devices). Использовали процент положительных клеток для оценивания окрашивания αSMA и, таким образом, степени перехода фибробластов в миофибробласты. Выполняли совместное окрашивание клеточных ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) для определения числа клеток, как меры потенциальной токсичности, и/или для нормализации αSMA по различиям в плотности клеток.

Оценивание продолжительности действия тестируемых соединений на индуцированное PDGF-BB фосфорилирование PDGFRβ в человеческих фетальных фибробластных клетках легкого.

Для определения относительной персистенции эффектов воздействия лекарственного средства на индуцированное PDGF-BB фосфорилирование PDGFRβ использовали эксперимент промывания с применением человеческих фетальных фибробластных клеток легкого MRC-5 и набор для клеточного анализа (Cisbio) Homogenous HTRF (гомогенная флуоресценция с временным разрешением) фосфо-PDGFRβ (Tyr751), с помощью которого выявляли рецепторную модуляцию индуцированного PDGF-BB фосфорилирования PDGFRβ.

Протокол промывания.

Сначала клетки MRC-5 отделяли трипсином и нейтрализовали полной средой (ростовой средой DMEM, 10% FBS). 1,2×10⁶ клеток помещали в микроцентрифужные пробирки, центрифугировали при 10000 об/мин течение 30 с с использованием настольной центрифуги, супернатант удаляли, а клетки промывали в 1 мл предварительно нагретого (37°C) буфера для промывания (HBSS, pH 7,4, 0,1% BSA и 0,04% плурониловой кислоты) для удаления какого-либо остаточного FBS. Затем клетки снова центрифугировали, супернатант удаляли и инкубировали с 500 мкл среды-носителя, тестируемого контрольного соединения и тестируемого соединения (при концентрации, обеспечивающей 70% ингибирование) в течение 1 ч с осторожным встряхиванием при 37°C. После инкубации клетки равномерно диспергировали и 100-мкл аликвоту извлекали из каждой пробирки для контроля без промывания. Затем остальные клетки подвергали 5 повторяющимся стадиям промывания, при которых клетки центрифугировали, супернатант удаляли и повторно суспендировали в 1 мл свежего предварительно нагретого (37°C) буфера для промывания. Чтобы избежать эффектов переноса соединения из-за прилипания к пластику, клетки переносили в свежие пробирки после каждой стадии промывания и помещали в шейкер (900 об/мин) при

37°C для 10-минутной инкубации между промываниями для обеспечения восстановления равновесия между клетками и буфером. После финальной стадии промывания клетки повторно суспендировали в 360 мкл предварительно нагретого буфера для промывания. По 5 мкл как из пробирок без промывания, так и из пробирок с промыванием помещали в 384-луночный белый полипропиленовый микротитровальный планшет (Greiner) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Затем клетки стимулировали 5 мкл rhuPDGF-BB (3 нг/мл, R&D Systems) в течение 5 мин, после чего клетки сразу же лизировали путем добавления 10 мкл буфера для лизиса, представленного в аналитическом наборе HTRF. Клетки помещали в шейкер для планшетов (1450 оборотов в минуту) на 1 ч, после чего планшет быстро центрифугировали в течение 30 с (3000 об/мин) и добавляли реагенты из набора HTRF собственного изготовления согласно инструкциям в наборе. Фосфорилирование PDGFR β определяли количественно путем вычисления отношения считывания флуоресценции при 665 и 620 нм. Процент ингибирования индуцированного rhuPDGF-BB фосфорилирования PDGFR β тестируемым соединением вычисляли как процент такового, достигаемого при 3 мкг/мл rhuPDGF-BB, по Анализу проницаемости PAMPA.

С помощью данного анализа измеряли проницаемость по всей искусственной мембране и выполняли его на Cypotex с использованием параллельного анализа проницаемости искусственной мембраны. Он представляет собой *in vitro* модель пассивного, трансцеллюлярного проникновения через искусственную гексадекановую мембрану (Wohnsland F. et al., Med. Chem., 2001 44; 923-930). Соединения могут быть разделены по низкой и высокой проницаемости. Как правило, соединения, которые имеют $P_{app} < 10 \times 10^{-6}$ см/с, классифицируют как соединения с низкой проницаемостью, а соединения с $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ см/с, классифицируют как соединения с высокой проницаемостью. Считают, что соединения, имеющие низкую проницаемость, вероятно имеют длительное время нахождения в легком из-за их более медленной абсорбции (Tronde Ann et al., J. Pharm. Sci., 2003, 92(6), 1216-33).

Краткое описание протокола.

Тестируемое соединение добавляли на донорную сторону фильтра, покрытого искусственной мембраной PAMPA, и проницаемость измеряли с помощью мониторинга появления тестируемого соединения на акцепторной стороне клеточной мембраны с использованием LC-MS/MS.

Экспериментальная процедура.

Готовили раствор гексадекана в гексане (5% об./об.) и добавляли аликвоту на мембрану в каждой лунке фильтровального (донорного) планшета (фильтровального планшета Multiscreen для проницаемости, Millipore). Затем обеспечивали высыхание донорных планшетов для гарантии выпаривания гексана.

Добавляли буфер (pH 7), содержащий DMSO (5%), в каждую лунку акцепторных планшетов. Готовили растворы тестируемых соединений путем разбавления 10 mM концентратов DMSO буфером с получением финальной концентрации тестируемого соединения 10 мкМ (финальной концентрации DMSO 5%). Также включали флуоресцентный маркер целостности люцифер желтый в раствор тестируемого соединения. Донорный планшет вставляли в акцепторный планшет и затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 5 ч. Из растворов тестируемых соединений готовили аналитические стандарты. Проницаемость тестируемого соединения оценивали в четырех повторностях. В каждом планшете в качестве контролей использовали соединения с известными характеристиками проницаемости.

В конце периода инкубации донорный планшет извлекали из акцепторного планшета. Определяли количество в донорных и акцепторных образцах тестируемых и контрольных соединений с помощью кассетного анализа LC-MS/MS с использованием 5-точечной калибровки с соответствующим разбавлением образцов. Экспериментальное восстановление вычисляли по концентрациям как донорного, так и акцепторного компартмента.

Если проникновение люцифера желтого превышало пределы QC для одной, двух или трех отдельных лунок тестируемого соединения, то сообщали результаты $n = 3$, 2 или 1.

Анализ данных.

Коэффициент эффективной проницаемости (P_{app}) для каждого соединения вычисляли по следующему уравнению:

$$P_{app} = \left\{ C \times -\ln \left(1 - \frac{[\text{лекарственное средство}]_{\text{акцепт. орг.}}}{[\text{лекарственное средство}]_{\text{равновес.}}} \right) \right\},$$

при этом

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times \text{Площадь} \times \text{время}},$$

в котором V_D и V_A представляют собой объемы донорного и акцепторного компартментов, соответственно, площадь представляет собой площадь поверхности мембраны, умноженную на пористость, а равновесная концентрация лекарственного средства представляет собой концентрацию тестируемого соединения в суммарном объеме донорного и акцепторного компартментов.

In vivo скрининг: фармакодинамические и фармакокинетические показатели.

Индукцированный блеомицином фиброз у мышей (мышинная модель легочного фиброза).

Мышам C57BL/6J внутритрахеальным путем вводили дозу либо среды-носителя, либо блеомицина сульфата (MP Biomedicals, 2 ед./кг) в день 0. Соединения вводили внутриназально (в виде водных растворов или суспензий, 25-50 мкл) один раз в сутки от дня 5 до дня 20. Еще через 24 ч животных анестези-

зировали, канюлировали им трахеи и животных механически вентилировали с использованием управляемого компьютером поршневого вентилятора (FlexiVent, SCIREQ Inc., Montreal, Canada). После измерений функции легких мышцей обескровливали и экстрагировали жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF). Количества суммарных и отдельных видов лейкоцитов в образцах BALF измеряли с использованием гемоцитометра Neubauer. Получали цитоспиновые мазки образцов BALF с помощью центрифугирования и окрашивания с использованием системы окрашивания DiffQuik (Dade Behring). Подсчитывали клетки с использованием масляно-иммерсионной микроскопии. Оставшиеся супернатанты BALF сохраняли для анализа цитокина.

Целые легкие накачиваются под давлением 25 см H₂O с 10% нейтральным забуференным формалином через трахеальную канюлю и погружали в формалин по меньшей мере на 24 ч. После запаивания в парафиновые блоки легкие нарезали на срезы (5 мкм) и окрашивали или гематоксилином и эозином (H&E), пикросириусом красным (PSR) или трихромом по Массону. Постоянное количество изображений произвольно получали из 4 поперечных срезов. Изображения оценивались в баллах от 0 (отсутствие PF) до 8 (максимальный PF) 2 исследователями слепым методом для оценки фиброзных изменений в легких. Кроме того, выполняли окрашивание по актину α -гладких мышц (Thermo Scientific, Freemont, CA) с использованием стандартных методик. Растворимый коллаген в гомогенате цельного легкого оценивали с помощью анализа коллагена Sircol (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK).

Индукционное PDGFBB фосфорилирование PDGFR β у мышей.

Мышей C57BL/6 (Charles River) возрастом 7-12 недель размещали при 12-часовом цикле свет/темнота и давали им корм и воду ad libitum. Водные растворы или суспензии соединений готовили для доставки указанных доз (мг/кг) на основе средней массы мышей в группах. Животных анестезировали и вводили соединения или среды-носители внутриназально (50 мкл). После восстановления в указанные моменты времени животных снова анестезировали и внутритрахеально вводили рекомбинантный мышинный PDGF-BB (50 мкг/животное, Cambridge Biosciences) или среду-носитель, а затем через 5-30 мин после вливания PDGF-BB забирали окончательные образцы крови и иссекали целые легкие. Из крови выделяли плазму путем центрифугирования. Приблизительно половину левых долей гомогенизировали с использованием устройства FastPrep-24 5G в пробирках для лизиса Matrix D (MP Biomedicals). Измеряли уровни фосфорилирования PDGFR β с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против фосфо-PDGFR α (Y849)/ β (Y857), против суммарного PDGFR β / α и против GAPDH (Cell Signaling). Уровни фосфорилирования PDGFR β описывали как отношения к суммарному содержанию PDGFR β или к GAPDH. Вычисляли процент ингибирования фосфорилирования PDGFR β для каждой обработки относительно обработки средой-носителем. Осуществляли измерения содержаний соединений в плазме или гомогенатах легких с помощью LC-MS/MS.

Фармакокинетические измерения у грызунов.

Для фармакокинетических исследований использовали самцов крыс CD или C57BL/6J, при этом дозы животным вводили внутритрахеально, перорально или внутривенно для крыс и внутриназально, перорально или внутривенно для мышей.

Животным вводили дозу внутривенно через боковую хвостовую вену. Животных, которым вводили дозу внутритрахеальным или внутриназальным путем, анестезировали перед введением дозы с использованием изофлурана, а также оксида одновалентного азота в исследования на крысах или кислорода в исследованиях на мышах.

Животных канюлировали в боковую хвостовую вену и помещали в камеру с подогревом (37-40°C) приблизительно на 5 мин перед каждым моментом времени забора образцов для расширения хвостовых вен. Соединения составляли в виде растворов для внутривенного введения и в виде растворов или суспензий для всех других способов. Животных взвешивали в день введения дозы и осуществляли однократное введение состава с объемом, регулируемым согласно индивидуальной массе тела (табл. 3). Для серийных образцов брали 150-200-мкл образцы крови крысы или 20-мкл образцы крови мыши (с добавлением одинакового объема воды) из отверстия канюли в покрытые K₂EDTA пробирки Microtainer в предварительно определенные моменты времени на протяжении 24 ч. Плазму выделяли путем центрифугирования (с относительным центробежным ускорением (rcf) 8200 в течение 5 мин), только в исследованиях на крысах.

При завершении образцы крови собирали через нисходящую полую вену в покрытые K₂EDTA пробирки Microtainer и получали жидкость BAL путем промывания легких через трахею вливаниями 3×4 мл 4% BSA в PBS для крыс и вливаниями 3×0,4 мл 4% BSA в PBS для мышей. Легкие иссекали, взвешивали, регистрировали массы и быстро замораживали в жидком азоте.

Измерения содержания соединений в плазме или крови, гомогенатах легких и жидкости BAL осуществляли с помощью LC-MS/MS. Лекарственное средство экстрагировали путем осаждения белка с использованием избытка растворителя, содержащего соответствующий внутренний стандарт. Концентрации лекарственного средства определяли по кривой, построенной по внешнему стандарту, совместному с матрицей.

Концентрации лекарственного средства наносили на график в полулогарифмическом масштабе в

зависимости от времени (см. фиг. 1, 2 и 3). Стандартные фармакокинетические параметры вычисляли с использованием некомпартментного анализа. Концентрации в легком и жидкости BAL в каждый момент времени выражали как процент вводимой дозы.

Таблица 3. Объем введения

Путь введения	Мышь	Крыса
Внутриназальный (i.n.)	1,5 мл/кг	Не использовали
Внутритрахеальный (i.t.)	Не использовали	0,5 мл/кг
Пероральный (p.o.)	10 мл/кг	10 мл/кг
Внутривенный (i.v.)	2 мл/кг	1 мл/кг

Результаты.

Результаты тестирования в анализах ингибирования фермента, а также в клеточных и других *in vitro* анализах представлены в приведенных ниже табл. 4-8 и на фиг. 1-3.

Таблица 4. Ингибиторные активности соединений в соответствии с настоящим изобретением и нинтеданиба в отношении FGFR1, FGFR3, PDGFR α , PDGFR β , VEGFR1 и VEGFR2

Анализы ферментов						
	K _i (nM)					
Номер примера	FGFR1	FGFR3	PDGFR α	PDGFR β	VEGFR1	VEGFR2
Нинтеданиб*	32	5.9	8.4	8.0	113	3.8
1	35	13.8	12.3	9.93	97.6	22.9
2	44.9	14.8	18.2	11.1	123	28.8
3	34.1	12.9	10.7	6.86	73.1	27.7
4	29.3	8.07	11.3	11.6	74	16.7
5	43.7	10.4	12.2	12.9	72.6	36
6	28.4	7.35	9.41	10.3	80.8	21.2
7	35	15.7	7.82	5.76	146	23
8	41.8	17.1	10.9	8.12	150	18.8
9	38.7	9.42	8.36	7.89	133	17.3

10	82.3	15.2	16.2	12.7	184	34.2
11	23.9	14.1	12.3	10.6	90.7	5.06
12	22.4	11.5	14.2	8.75	61.9	6.38
13	19.6	7.16	16.5	10.4	41.6	19.5
14	19.7	5.51	13.3	9.6	52.3	15.3
15	7.9	2.5	5.0	5.0	50	5.0
16	57.9	11.4	15.9	13	245	45.6
17	16.6	5.31	7.81	9.39	31.6	6.4
18	36.6	13.7	14.1	7.99	57.5	25.7
19	13.6	9.04	6.55	8.79	47.7	8.35
20	48.5	30	24.2	19.1	178	83.7
21	27.1	10.7	9.38	6.11	95.5	24.8
22	16.3	9.53	9.75	9.29	63.2	12.4
23	434	73.2	51.9	84.6	513	154
24	65.2	14.3	10.5	12.7	252	31.1
25	23.5	12.7	13	11.7	112	32.7
26	108	32.1	41	45	392	62.5
27	61	17.9	20.4	18	177	57.8
28	134	62.6	35.9	20	305	71.2
29	27.6	23.2	10.7	11.2	103	16.4
30	32.3	19.5	11	10	65.1	8
31	15.3	12.2	10.2	4.83	29.6	4.96
32	9.03	6.65	7.38	5.02	31.4	7.56
33	14.3	7.4	8.89	6.82	42.6	3.56
34	98.8	25.9	24.6	14.4	159	18.7
35	66.6	19.9	24.7	17	163	54.7
36	71.9	18.5	21.7	15.9	84.8	15
37	8.56	11.2	10.7	7.54	45.4	9.97
38	9.73	6.93	7.53	4.79	36.2	3.26
39	47.4	14.7	15.3	14.1	133	31.6
40	78.1	14.9	33.7	12.8	78.2	27
41	23.8	9.31	13.8	10.2	49.7	17.7
42	33.8	15.7	18.3	14.4	80.6	31.1
43	112	20.7	30.8	25.2	66.9	11.9
44	229	22	27.3	17.8	220	28.8
45	40.2	18.8	20	15.1	103	13
46	7.92	7.78	6.86	6.65	30.7	4.15
47	171	25.5	53.8	98.9	216	43.2
48	11.3	8.47	8.92	9.49	52.7	3.68
49	19.6	7.16	16.5	10.4	41.6	19.5
50	19.7	5.51	13.3	9.6	52.3	9.6
51	24.2	10.8	н. о.	н. о.	79.3	20.8
52	50.8	19.2	н. о.	н. о.	251	30.6
53	25.2	10.4	н. о.	н. о.	71.5	20.8
54	100	39.8	25.1	15.8	316	50.1
55	79.4	15.8	25.1	25.1	316	39.8
56	39.8	12.6	12.6	12.6	126	15.8

н. о.: не определяли; n = 2, если не указано иное (среднее); *n = 34

Таблица 5. Ингибиторные эффекты соединений в соответствии с изобретением и нинтеданиба в отношении индуцированного PDGFBB фосфорилирования PDGFR β в фибробластных клетках MRC5 и в отношении индуцированного VEGF₁₆₅ фосфорилирования VEGFR2 в эндотелиальных клетках

Фосфорилирование рецептора (IC ₅₀ , нМ)		
Номер примера	Индукцированное PDGFBB фосфорилирование PDGFR β в клетках MRC5	Индукцированное VEGF ₁₆₅ фосфорилирование VEGFR2 в клетках HAEC
Нинтеданиб	7.07 (n=8)	0.594 (n=13)
1	25.6 (n=2)	2.47 (n=2)
2	36.7	17.7
3	12.7 (n=2)	10.6
4	14 (n=2)	4.38
5	15 (n=2)	9.24 (n=2)
6	13.2 (n=2)	12.7 (n=2)
7	6.04 (n=2)	2.53 (n=2)

8	12 (n=2)	4.58
9	14.2 (n=2)	5.68 (n=2)
10	15.9	10.8 (n=2)
11	2.75	1.1
12	4.23	10.1
13	1.25	8.3
14	6.97	24.1
15	6.49	1.84
16	н. о.	8.89
17	4.48	3.11
18	16.8 (n=2)	8.15 (n=2)
19	5.04	0.765
20	38.9	17.1
21	35.1	23.6
22	12.3	31.9
23	22.6	942
24	12.3	4.96
25	24.2	10.8
26	18.1	4.08
27	43	16.7
28	51.3	14.9
29	3.65	3.46
30	6.02	0.204
31	5.52	2.99
32	4.53	3.88
33	2.32	н. о.
34	4.71	6.88
35	17.3	11.6
36	9.96	7.61
37	5.28	4.63
38	1.7	8.78
39	5.95	2.11
40	13.4	72.2
41	7.4	5.82

42	14.9	28.3
43	2.31	н. о.
44	3.33	6.99
45	2.42	3.16
46	2.49	1.5
47	3.67	3.17
48	2.29	н. о.
49	1.25	8.3
50	6.97	24.1
51	6.71	10.5
52	5.49	4.28
53	6.5	4.58
54	5.04	6.29
55	9.13	10.2
56	9.16	6.68

н. о.: не определяли; n = 1, если не указано иное

Таблица 6. Эффект соединений в соответствии с изобретением и нинтеданиба в отношении жизнеспособности клеток на клетках MRC5 (анализ МТТ)

Анализ жизнеспособности клеток на клетках MRC5 (МТТ)			
Номер примера	Жизнеспособность клеток при 1000 нМ (%)	Жизнеспособность клеток при 300 нМ (%)	Жизнеспособность клеток при 100 нМ (%)
Нинтеданиб (n=30)	92.7	105.6	104.6
1 (n=4)	68.7	89	103.6
2	68.5	91	94
3 (n=4)	79.5	86.1	88
4 (n=4)	70.9	83.2	80.6
5 (n=4)	84.8	81	91.5
6 (n=4)	91.2	98.9	102.3
7 (n=3)	67.5	97.2	102.9
8 (n=3)	77.7	108.2	110.4

9 (n=3)	97.5	103.6	102
10	108.4	118.9	85
11	28.5	67.8	82
12	93.4	105.5	92.2
13	102.1	93.2	84.3
14	61	107.9	116.2
15	85.6	109.9	91.3
16	70.6	104.3	103.2
17 (n=3)	34.1	63.6	76.2
18 (n=4)	91.8	97.3	98.2
19	21.9	71.8	85.5
20	87.2	91.7	92.6
21	98.8	127.3	139.6
22	48.8	58.8	72.3
23	62.1	100.5	90.7
24	45.9	74.4	125.2
25	55.4	74.7	83.2
26	57.6	91.6	84.4
27	82.9	112.6	106.5
28	83.6	97.6	149.4
29	60.8	72.5	116.9
30	16.4	85.3	107.2
31	34.3	47.3	69.3
32	49.4	129.3	99.3
33	19.8	63.1	86.6
34	16.2	74.4	82.9
35	99.1	122.5	99.8
36	69.6	77.2	87.3
37	18.4	83.4	93.6
38	4.2	63	70.7
39	36.7	73.3	96.2
40	82.9	88	95.4
41	6.2	56.8	68.5
42	60.7	83.4	82.5

43	6.4	58.8	72.2
44	60.4	78.4	98.4
45	62.8	71.7	80.1
46	18.2	80.2	87
47	58.5	123	143.1
48	14.1	74.4	84.4
49	102.1	93.2	84.3
50	61.0	107.9	116.2
51	83.8	95.5	113
52	85.9	81.2	81.3
53	95.3	92.9	89.1
54	92.4	105.5	110.2
55	101.7	101.5	79.4
56	102.0	104.9	100.0

n = 1, если не указано иное.

Таблица 7. Определение P_{app} для соединений в соответствии с изобретением в анализе проницаемости РАМРА

	Данные анализа РАМРА			
№ примера*	Среднее P_{app} (10^{-6} см s^{-1})	SD P_{app}	N P_{app}	% восстановления
Нинтеданиб	0.277	0.151	4	83.5
Нинтеданиб (повтор)	0.129	0.0547	4	64.0
1	0.123	0.0586	4	92.0
2	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
3	0.00775	0.00480	2	92.4
4	0.0216	0.00968	4	76.0
5	0.00254	0.000276	4	58.7
6	0.0120	0.00415	4	56.5
7	0.00653	0.00208	4	56.3
8	0.156	0.0925	4	87.8
9	0.0146	0.0144	3	72.7

10	0.0428	0.0207	3	70.4
11	0.0479	0.0136	4	93.2
12	0.00638	0.000688	2	87.7
13	0.0439	н. о.	1	76.3
14	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
15	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
16	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
17	24.6	6.76	4	59.8
18	0.00383	н. о.	1	84.5
19	0.589	0.189	4	61.8
20	0.0165	0.00927	4	104
21	0.0442	0.0182	4	76.0
22	0.0460	0.00625	4	101
23	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
24	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
25	11.0	4.21	4	105
26	10.3	1.09	4	96.2
27	16.8	5.25	4	54.3
28	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
29	0.373	0.0168	4	72.1
30	0.0235	0.00544	4	87.2
31	0.00531	0.00133	4	66.2
32	0.0217	0.00799	4	59.6
33	0.0269	0.0117	4	69.1
34	0.00748	0.00338	3	41.1
35	10.7	4.14	4	79.2
36	8.96	3.22	4	77.4
37	0.0542	0.0147	4	68.2
38	0.0269	0.0154	4	70.3
39	0.633	0.124	4	85.7
40	26.5	11.6	4	56.0
41	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
42	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
43	0.865	0.211	2	72.2

44	0.00879	0.00701	2	71.7
45	0.0893	0.0140	2	77.0
46	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
47	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
48	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
49	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
50	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
51	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
52	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
53	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
54	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
55	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
56	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.

н. о. = не определяли

Таблица 8. Фармакокинетические измерения за период в 24 ч у крыс, которым внутривенно (i.v.) и интритрахеально (i.t.) вводили дозу соединений в соответствии с изобретением или нинтеданиба

Номер примера	Нинтеданиб	3	4	5	6	7	9	18
исследования с i.v. введением дозы								
i.v. доза	0.42	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
CL (мл/минута/ кг)	124	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	75	90	н. о.
Vss (л/кг)	28	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	3.4	7	н. о.
t1/2 (часы)	3.9	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	0.6	1.1	5.1
MRT (часы)	3.8	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	0.7	1.1	н. о.
Концентрация в легком (нМ) на момент времени								

(часы)								
0.1	2304	761	959	765	1002	99	494	638
1.5	1392	700	641	330	949	44	174	306
6	н. о.	321	156	499	939	BQL	235	201
24	66	135	88	247	837	BQL	502	41
Отношение концентрации и в легком/плаз ме на момент времени (часы)								
0.1	92	38	86	127	77	2	17	39
1.5	226	154	137	>188	>558	12	55	69
6	н. о.	120	58	>284	>552	NC	>326	71
24	>80	>72	>50	>140	>492	NC	>697	>21.5
% введенной дозы в BAL на момент времени (часы)								
0.1	0.06	0.1	0.07	BQL	BQL	0.06	BQL	0.13
1.5	0.03	0.1	0.04	BQL	BQL	BQL	BQL	0
6	н. о.	0.03	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
24	BQL	0.02	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
исследования с i.t. введением дозы								
i.t. доза	0.42	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
i.t. BAV (%)	43	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	35	<40	39
Концентрация в легком (нМ) на момент времени								

(часы)								
0.1	12396	2605	3490	5506	9826	1532	5701	6533
1.5	7699	4986	1214	4022	7568	886	8813	5987
6	н. о.	4675	475	1067	7815	116	10466	2351
24	152	1863	370	1674	6438	27	10465	4523
Отношение концентрации и в легком/плаз ме на момент времени (часы)								
0.1	1227	100	290	371	472	39	>7890	346
1.5	1607	1911	523	>2285	>4452	>265	>12197	2318
6	н. о.	2152	251	>606	>4597	>35	>14485	1197
24	>183	>10 04	>206	>951	>3787	>8	>14483	>2373
% введенной дозы в BAL на момент времени (часы)								
0.1	2	14	3.4	13.6	14	3.5	13.7	6.7
1.5	1	1.2	0.4	0.9	0.9	0.6	5.2	2.2
6	н. о.	0.7	0.4	0.2	1.1	0.1	2.3	0.4
24	0.1	0.3	0.3	0.2	0.9	BQL	0.5	0.3
Отношение концентрации и в легком при i.t. введении/i.v. введении на момент								
времени (часы)								
0.1	5.4	3	3.6	7	9.8	15.5	12	10
1.5	5.5	7	1.9	12	8.0	20.1	51	20
6	н. о.	15	3.0	2	8.3	>42	45	12
24	2.3	14	4.2	7	7.7	>10	21	110
Исследования с пероральным введением дозы								
Пероральная доза (мг/кг)	-	3	3	3	3	3	3	3
BAV перорально (%)	-	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	<7	<2	н. о.

н. о.: не определяли.

NC: не вычисляли из-за одного параметра, находящегося BLQ.

BLQ: ниже уровня количественного определения.

CL: очищение.

Vss: объем распределения.

MRT: среднее время удержания.

BAV: биологическая доступность.

BAL: бронхоальвеолярное орошение,

где значение $>$ или $<$ отмечено как значение, основанное на нижней границе количественного анализа из биоаналитического метода.

Краткое описание результатов.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением, раскрываемые в настоящем документе, демонстрируют ингибиторную активность в отношении FGFR1, FGFR3, PDGFR α , PDGFR β , VEGFR1 и VEGFR2 (табл. 4 и 5) и наномолярную эффективность. Подавляющее большинство тестируемых соединений не оказывают неблагоприятных эффектов в анализах жизнеспособности клеток (табл. 6). Более того, соединения, как правило, обладают низкой проницаемостью сквозь мембраны (табл. 7 и фиг. 1). Фармакокинетические измерения показывают, что в целом соединения в соответствии с настоящим изобретением, как выяснилось, имеют более высокое относительное содержание, чем у нинтеданиба, сохраняющееся в легком через 24 ч после того, как субъекту была доставлена доза местным путем (табл. 8 и фиг. 2 и 3).

Фармакокинетические параметры также указывают на то, что соединения в соответствии с настоящим изобретением сохраняют более высокие уровни в легком при местной доставке по сравнению с эквивалентными дозами, доставляемыми i.v., и обычно такие более высокие относительные уровни выше соответствующих уровней нинтеданиба в особенности в момент времени 24 ч. Низкое содержание в BAL, отмеченное вместе с уменьшающимися количествами на протяжении 24-часового периода, указывают на то, что происходит быстрое растворение и всасывание в ткань легкого соединений в соответствии с настоящим изобретением.

Данный профиль указывает на то, что соединения в соответствии с настоящим изобретением, как предполагают, подходят в качестве медицинских препаратов *inter alia* для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных легочных заболеваний, таких как IPF, или респираторных нарушений, особенно при доставке в легкое местным путем.

Ссылки

Castriotta RJ, et al., *Chest*, **2010**, 138(3):693-703

Du Bois RM., *Nat Rev Drug Discov.*, **2010**, 9(2):129-40

Fehrenbach. H., et al., *Virchows Arch.*, **1999**, 435(1):20-31

King TE Jr, et al., *Lancet*, **2011**, 3;378(9807):1949-61

Lindroos. P., *Am J Physio Lung Cell Mol Physiol.*, **2001**, 280:L354-L362

Tronde Ann et al., *J Pharm. Sci.*, **2003**, 92(6), 1216-33

Selman M, et al., *Ann Intern Med.*, **2001**, 16;134(2):136-51

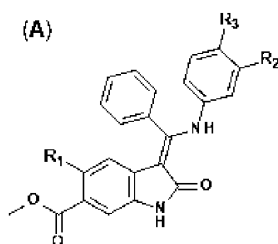
Wohnsland F et al., *Med Chem.*, **2001**, 44;923-930

По всему описанию и следующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как включение указанных целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий, но не как исключение каких-либо других целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий.

Все патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (A)

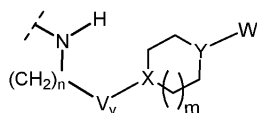


где R₁ представляет собой Me, Et, CH=CH₂, C $\equiv$ C-H или C $\equiv$ C-Me;

один из R₂ и R₃ представляет собой группу, выбранную из H, -C₁-C₆алкила, C₁-C₆алкокси, -C₃-C₈циклоалкила, -CH₂-(C₃-C₈циклоалкил), галогена и циано, а другой представляет собой группу -Z-R_x;

Z представляет собой CO или SO₂;

R_x представлен формулой (iv)



где V представляет собой CO;

где v представляет собой 0 или 1;

где n представляет собой 0, 1 или 2 при условии, что если v представляет собой 1, n представляет собой 1 или 2;

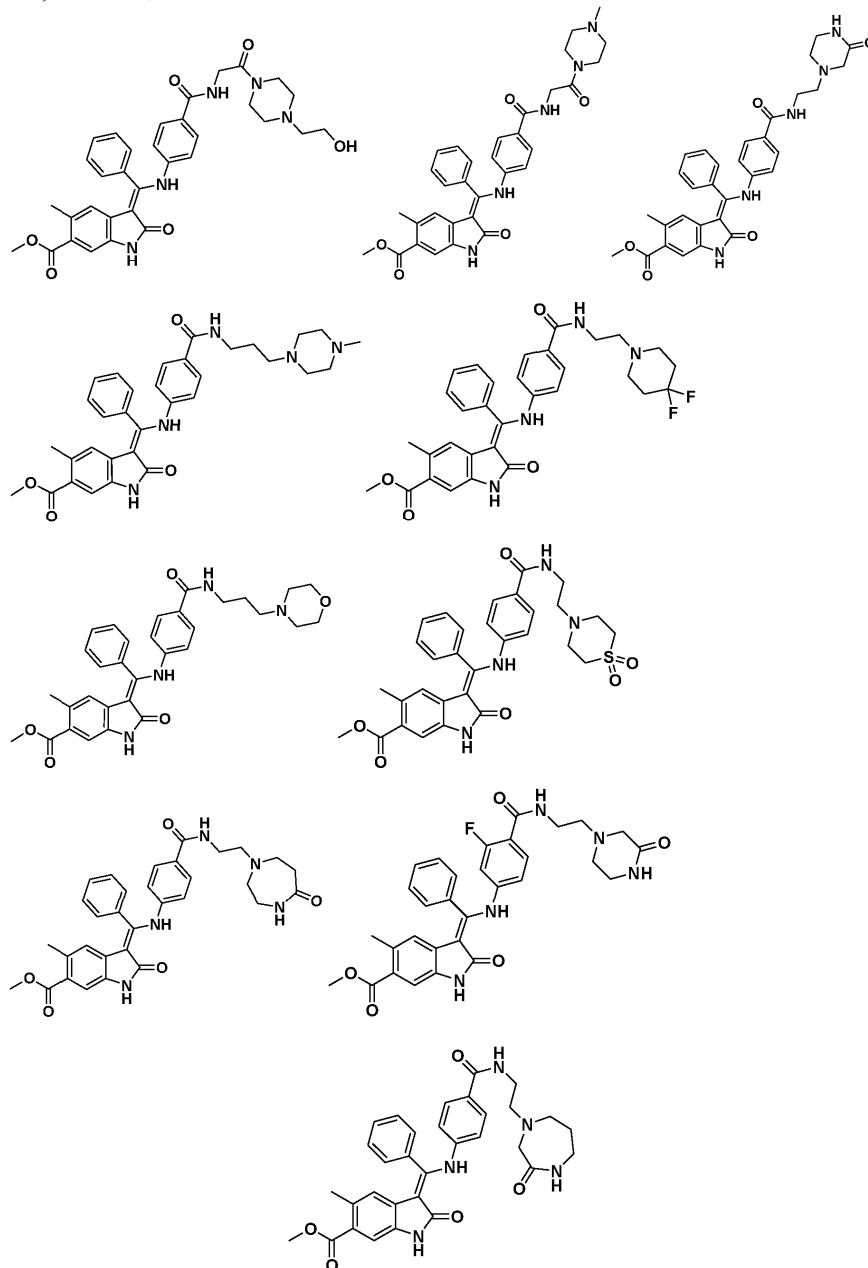
m представляет собой 1 или 2;

X представляет собой CH или N при условии, что если n представляет собой 0 или 1, X представляет собой CH;

Y представляет собой CH или N;

W представляет собой группу, выбранную из -C₁-C₄алкила, -C₁-C₄гидроксиалкила, C₁-C₄алкокси(C₁-C₄)алкил-, -C₁-C₄алкиленCONR₂₀R₂₁, -C₁-C₄алкиленNR₂₀COR₂₁, -SO₂(C₁-C₄)алкил, -CO(C₁-C₄)алкила, галогена, CN, OH и NR₂₂R₂₃, при условии, что если W представляет собой NR₂₂R₂₃, -C₁алкиленNR₂₀COR₂₁ или галоген, Y представляет собой CH;

R₂₀, R₂₁, R₂₂, R₂₃, R₂₄ и R₂₅ независимо представляют собой H или -C₁-C₄алкил; или соединение, выбранное из группы, состоящей из



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, где R_1 представляет собой Me.

3. Соединение по п.1 или 2, где Z представляет собой CO.

4. Соединение по любому из пп.1-3, где R_3 представляет собой $-Z-R_x$.

5. Соединение по любому из пп.1-4, где v представляет собой 1 и n представляет собой 1.

6. Соединение по любому из пп.1-5, где m представляет собой 1.

7. Соединение по любому из пп.1-6, где X представляет собой CH.

8. Соединение по любому из пп.1-7, где Y представляет собой N.

9. Соединение по любому из пп.1-8, где W представляет собой $-C_1-C_4$ алкил или $NR_{22}R_{23}$.

10. Соединение по п.1, которое выбрано из

(Z)-метил-5-метил-3-(((4-(N-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)сульфамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-(((1-метилпиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-(диметиламино)пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-2-оксо-3-(((4-((2-(3-оксопиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-индолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((3-(4-метилпиперазин-1-ил)-3-оксопропил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-гидроксипиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-(((1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил)метил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((1-метилпиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((1-(2-метоксиэтил)пиперидин-4-ил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-ацетилпиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-фторпиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((3-морфолинопропил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-ацетил-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(4-(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-3-(((4-((2-(4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((4-((2-(1,1-диоксидотиоморфолино)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-2-оксо-3-(((4-((2-(5-оксо-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-индолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-3-(((3-фтор-4-((2-(3-оксопиперазин-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-5-метил-2-оксоиндолин-6-карбоксилата;
 (Z)-метил-5-метил-2-оксо-3-(((4-((2-(3-оксо-1,4-дiazепан-1-ил)этил)карбамоил)фенил)амино)(фенил)метил)-индолин-6-карбоксилата;

и фармацевтически приемлемых солей любого из этих соединений.

11. Фармацевтическая композиция для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных заболеваний легких, содержащая соединение по любому из пп.1-10 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

12. Применение соединения по любому из пп.1-10 для изготовления лекарственного средства для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных заболеваний легких, выбранных из идиопатического легочного фиброза (IPF), гигантоклеточной интерстициальной пневмонии, саркоидоза, кистозного фиброза, респираторного дистресс-синдрома, индуцированного лекарственным средством легочного фиброза, гранулематоза, силикоза, асбестоза, вызванного вирусом цирроза печени; или заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из склеродермии, саркоидоза и системной красной волчанки; или заболеваний, характеризующихся гиперпролиферацией клеток, выбранных из рака, или респираторных нарушений, выбранных из хронической обструктивной болезни лёгких (COPD), хронического бронхита и эмфиземы, астмы, ринита и синусита.

13. Применение соединения по любому из пп.1-10 для изготовления лекарственного средства для лечения фиброзных заболеваний, выбранных из легочного фиброза, ассоциированного с ревматоидным артритом, респираторного дистресс-синдрома, острого повреждения легкого, вызванного облучением легочного фиброза или пневмонита, хронического гиперчувствительного пневмонита, системного склероза, синдрома Шегрена, интерстициальных легочных заболеваний и легочной артериальной гипертензии (РАН); или с заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из гипертрофированного рубцевания и келоидов; или глазных заболеваний, компонентом которых является фиброз, выбранных из глаукомы, возрастной дегенерации желтого пятна, диабетического отека желтого пятна, заболевания сухости глаз и диабетической ретинопатии; или фиброза в кишечнике, ассоциированного с воспалительным заболеванием кишечника.

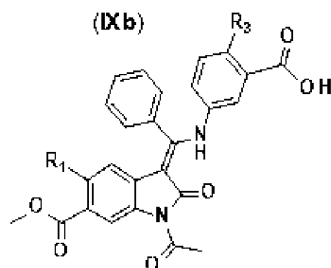
14. Применение соединения по любому из пп.1-10 в комбинации с нинтеданибом или пирфенидоном для лечения фиброзных заболеваний или интерстициальных заболеваний легких, выбранных из идиопатического легочного фиброза (IPF), гигантоклеточной интерстициальной пневмонии, саркоидоза, кистозного фиброза, респираторного дистресс-синдрома, индуцированного лекарственным средством легочного фиброза, гранулематоза, силикоза, асбестоза, вызванного вирусом цирроза печени; или заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из склеродермии, саркоидоза и системной красной волчанки; или заболеваний, характеризующихся гиперпролиферацией клеток, выбранных из рака; или респираторных нарушений, выбранных из хронической обструктивной болезни лёгких (COPD), хронического бронхита и эмфиземы, астмы, ринита и синусита.

15. Применение соединения по любому из пп.1-10 в комбинации с нинтеданибом или пирфенидоном для лечения фиброзных заболеваний, выбранных из легочного фиброза, ассоциированного с ревматоидным артритом, респираторного дистресс-синдрома, острого повреждения легкого, вызванного облучением легочного фиброза или пневмонита, хронического гиперчувствительного пневмонита, системного склероза, синдрома Шегрена, интерстициальных легочных заболеваний и легочной артериальной гипертензии (РАН); или заболеваний кожи с фиброзным компонентом, выбранных из гипертрофированного рубцевания и келоидов; или глазных заболеваний, компонентом которых является фиброз, выбранных из глаукомы, возрастной дегенерации желтого пятна, диабетического отека желтого пятна, заболевания сухости глаз и диабетической ретинопатии; или фиброза в кишечнике, ассоциированного с воспалительным заболеванием кишечника.

16. Применение по п.12 или 14, причем указанное заболевание выбрано из системной склеродермии, вызванной гепатитом С цирроза печени, рака легкого, астмы у детей, или аллергического ринита.

17. Применение по п.13 или 15, причем указанное заболевание представляет собой острый респираторный дистресс-синдром.

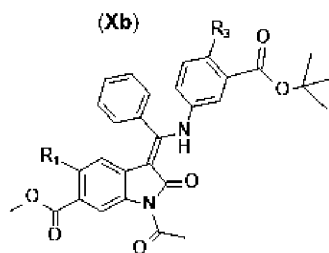
18. Соединение формулы (IXb)



где R_1 представляет собой Me, Et, $CH=CH_2$, $C\equiv C-H$ или $C\equiv C-Me$; и

R_3 независимо представляет собой H, C_1-C_6 алкил, C_1-C_6 алкокси, C_3-C_8 циклоалкил, $-CH_2-(C_3-C_8$ циклоалкил), галоген или циано; или его соль.

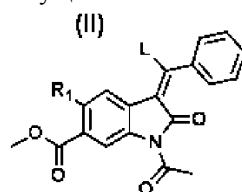
19. Соединение формулы (Xb)



где R_1 представляет собой Me, Et, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ или $\text{C}\equiv\text{C}-\text{Me}$; и

R_3 независимо представляет собой H, C_1-C_6 алкил, C_1-C_6 алкокси, C_3-C_8 циклоалкил, $-\text{CH}_2-(\text{C}_3-\text{C}_8$ циклоалкил), галоген или циано; или его соль.

20. Способ получения соединения формулы (A) или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-10, который включает в себя осуществление взаимодействия соединения формулы (II)

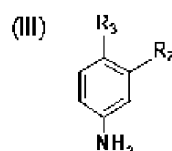


где R_1 определен в любом из пп.1-10;

или его соли;

L представляет собой уходящую группу;

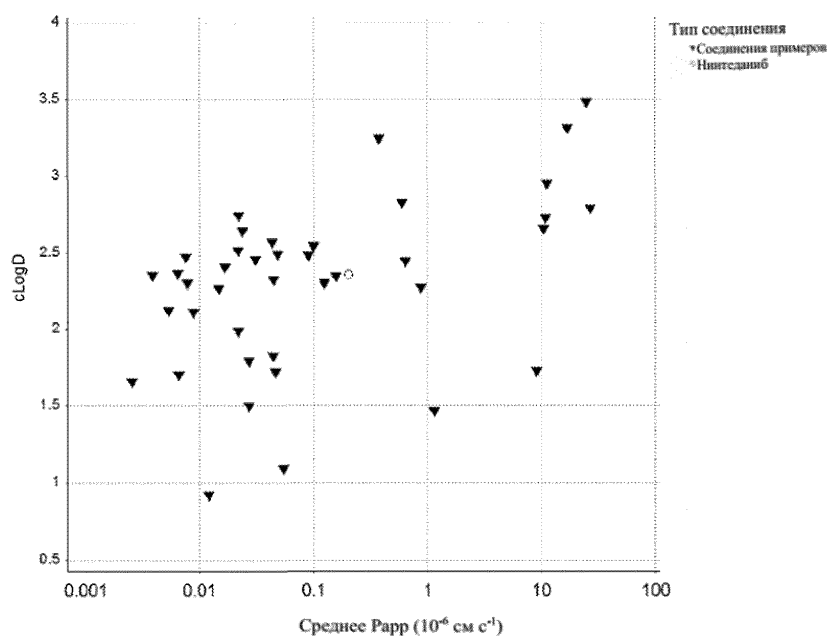
с соединением формулы (III)



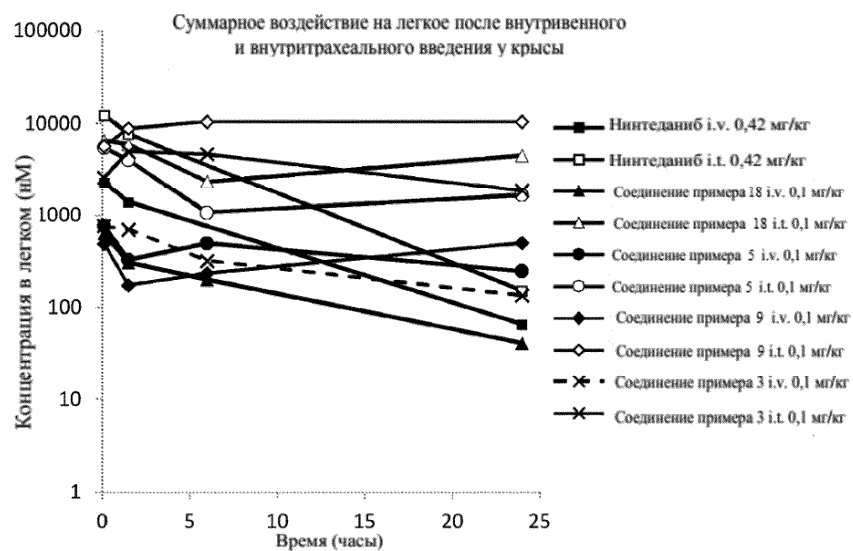
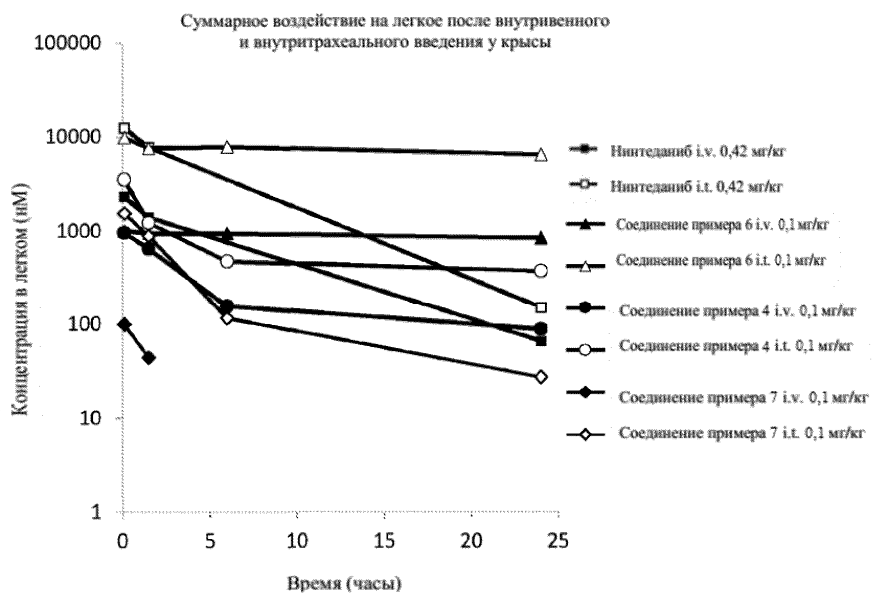
где R_2 и R_3 определены в любом из пп.1-10;

или его солью, и

удаление защитной ацетильной группы путем добавления нуклеофила.



Фиг. 1



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2