(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192513 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.14

(22) Дата подачи заявки
2020.03.13

(51) Int. Cl. *C07D 239/94* (2006.01)
C07D 405/04 (2006.01)
C07D 405/10 (2006.01)
C07D 491/056 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) **62/819,322; 62/904,241**
(32) **2019.03.15; 2019.09.23**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/022743**
(87) **WO 2020/190765 2020.09.24**
(88) **2020.11.26**

(71) Заявитель:
ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ (US)

(72) Изобретатель:
Натансон Девид А., Джунг Майкл Е., Тсанг Джонатан, Урнер Лоренц, Кларк Питер М., Клогези Тимоти Ф., Ким Гиудонг (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, которые способны проникать через гематоэнцефалический барьер, чтобы модулировать активность тирозинкиназы EGFR. Настоящее изобретение также относится к способам лечения глиобластомы и других видов рака, опосредованных EGFR. Настоящее изобретение также относится к способам лечения глиобластомы и других видов рака, опосредованных EGFR, которые, как было установлено, изменяют метаболизм глюкозы в присутствии ингибиторов. В настоящем описании также представлены способы введения субъекту ингибитора метаболизма глюкозы и цитоплазматического стабилизатора p53.

202192513 A1

202192513 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571020EA/085

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В настоящей заявке испрашиваются преимущества предварительной заявки США №№ 62/819,332, поданной 15 марта 2019 г., и 62/904 241, поданной 23 сентября 2019 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Глиобластома (мультиформная глиобластома; GBM) составляет большинство первичных злокачественных опухолей головного мозга у взрослых. Амплификация и мутация гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) является характерной генетической аномалией, встречающейся при GBM (Sugawa, et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 8602-8606; Ekstrand, et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 4309-4313). В настоящее время разрабатываются или проходят клинические испытания для лечения GBM ряд потенциальных терапевтических средств, нацеленных на EGFR или его мутантную конститутивно активную форму, ΔEGFR, включая ингибиторы тирозинкиназы (TKI), моноклональные антитела, вакцины и средства на основе РНК. Однако на сегодняшний день их эффективность в лечебном учреждении ограничена как первичной, так и приобретенной лекарственной устойчивостью (Taylor, et al. (2012) *Curr. Cancer Drug Targets.* 12:197-209). Основным ограничением является то, что современные методы лечения, такие как эрлотиниб, лапатиниб, гефитиниб и афатиниб, плохо проникают в мозг (Razier, et al. (2010) *Neuro-Oncology* 12:95-103; Reardon, et al. (2015) *Neuro-Oncology* 17:430-439; Thiessen, et al. (2010) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65:353-361).

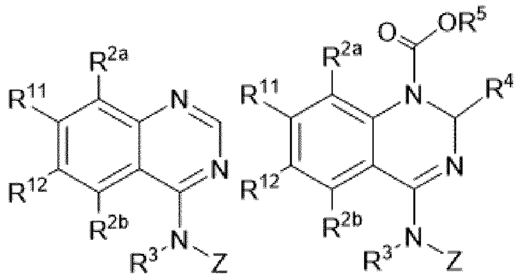
Молекулярная целевая терапия произвела революцию в лечении рака и проложила путь современной точной медицине. Однако, несмотря на четко определенные действенные генетические изменения, целевые препараты не помогли пациентам с глиобластомой (GBM). Это в значительной степени связано с недостаточным проникновением в ЦНС большинства целевых агентов до уровней, необходимых для уничтожения опухоли; потенциально вызывая надежные адаптивные механизмы для управления терапевтической резистентностью. В то время как комбинации лекарственных средств, которые ингибируют как первичное поражение, так и компенсаторные сигнальные пути, вызывают интерес, этим стратегиям комбинированной терапии препятствует повышенная токсичность, приводящая к подпороговому дозированию каждого лекарственного средства.

Альтернативный терапевтический подход нацелен на онкогенный фактор, чтобы изменить важное функциональное свойство для выживания опухоли, делая клетки уязвимыми для ортогонального второго удара[6]. Эта «синтетическая летальная» стратегия может быть особенно привлекательной, когда функциональная сеть (сети), регулируемая онкогеном, пересекается с путями гибели опухолевых клеток. В определенном примере онкогенная передача сигналов стимулирует метаболизм глюкозы, подавляя внутренний апоптоз и способствуя выживанию. Подавление онкогенных факторов с помощью целевой терапии может запускать внутренний механизм апоптоза как прямое следствие пониженного потребления глюкозы. Взаимосвязанная природа этих онкогенных путей может предоставить терапевтические возможности для рационального комбинированного лечения, однако это еще предстоит исследовать.

Ввиду вышеизложенного остается клиническая необходимость в химиотерапевтических средствах, проникающих в мозг, для лечения глиобластомы и других видов рака.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены соединения Формулы I или Формулы I*:



(I) (I*)

или их фармацевтически приемлемая соль, где:

Z представляет собой арил или гетероарил;

каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из водорода, алкила, галогена, CN и NO_2;

R^3 представляет собой водород, алкил или ацил;

R^4 представляет собой алкокси;

R^5 представляет собой алкил; каждый из R^7 и R^8 независимо выбран из водорода, алкила, такого как алкоксиалкил, аралкил или арилацил;

R^{11} представляет собой водород, алкил, галоген, CN, NO_2, OR^7, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; и

R^{12} представляет собой водород, алкил, галоген, CN, NO_2, OR^8, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; или R^{11} и R^{12}, взятые вместе, образуют карбоциклическое или гетероциклическое кольцо.

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования EGFR или ΔEGFR, включающие введение субъекту количества соединения по изобретению.

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении рака, количества соединения по изобретению. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому.

В определенных аспектах настоящее изобретение обеспечивает способы лечения рака, включающие введение субъекту ингибитора метаболизма глюкозы и цитоплазматического стабилизатора p53, где ингибитор метаболизма глюкозы представляет собой соединение по изобретению. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому.

В определенных аспектах настоящего изобретения предусмотрены способы получения соединений Формулы I или Формулы I*.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана фармакокинетика при пероральном введении JGK005 при 10 мг/кг и фармакокинетика при пероральном введении эрлотиниба при 25 мг/кг. JGK005 характеризуется хорошим проникновением в ЦНС по сравнению с эрлотинибом.

На фиг. 2 показана активность эрлотиниба (левые столбцы) и JGK005 (правые столбцы) против мутантных по EGFR глиобластом HK301 и GBM39 соответственно. JGK005 имеет более низкую активность, чем эрлотиниб в обоих случаях.

На фиг. 3 показаны активности внеклеточной киназы EGFR эрлотиниба и JGK010. Оба соединения имеют значение IC_{50} приблизительно 8 нМ.

На фиг. 4 показана эффективность эрлотиниба (левые столбцы), JGK005 (центральные столбцы) и JGK010 (правые столбцы) против клеток HK301 и GBM39.

На фиг. 5 показана фармакокинетика при пероральном введении JGK005 при 10 мг/кг и JGK010 при 10 мг/кг.

На фиг. 6 показаны сравнения ингибиторов EGFR в нескольких клеточных линиях первичной глиобластомы. Столбцы 1-4: GBM39 (EGFRvIII), 5-8: GS100 (EGFRwt/EGFRvIII), 9-12: GS017 (A289T), 13-16: GS024 (полисомия EGFR).

На фиг. 7А показана активность JGK010 в измененном по EGFR раке легкого. **На фиг. 7В** показана активность JGK010 в эпидермоидной карциноме EGFR Amp.

На фиг. 8А показана фармакокинетика JGK010 при пероральном введении при 6 мг/кг. **На фиг. 8В** показана фармакокинетика JGK010 при пероральном введении при 10 мг/кг. **На фиг. 8С** показана фармакокинетика JGK010 при внутривенном введении при 6 мг/кг. **На фиг. 8D** показана фармакокинетика JGK010 при внутрибрюшинном введении при 6 мг/кг.

На фиг. 9 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против EGFR Amp WT+vIII HK301.

На фиг. 10 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против EGFR vIII Amp GBM 39.

На фиг. 11 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против клеток HK301.

На фиг. 12 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против клеток GBM39.

На фиг. 13А показано ингибирование с помощью фосфор-EGFR vIII эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению. **На фиг. 13В** показано ингибирование с помощью фосфор-EGFR vIII эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению.

На фиг. 14А показана фармакокинетика JGK005. **На фиг. 14В** показана фармакокинетика JGK005.

На фиг. 15А показана фармакокинетика JGK038. **На фиг. 15В** показана фармакокинетика JGK038.

На фиг. 16A показана фармакокинетика JGK010. **На фиг. 16B** показана фармакокинетика JGK010.

На фиг. 17A показана фармакокинетика JGK037. **На фиг. 17B** показана фармакокинетика JGK037.

На фиг. 18A показано сравнение фармакокинетики эрлотиниба и JGK037 в головном мозге/крови мыши. **На фиг. 18B** показано сравнение фармакокинетики эрлотиниба и JGK037 в головном мозге/крови мыши.

На фиг. 19 показано проникновение в мозг эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению.

На фиг. 20 показан эффект лечения либо носителем, либо JGK037 на изменение RLU.

На **фиг. 21A-21F** показано ингибирование EGFR-вызванного метаболизма глюкозы, которое вызывает минимальную гибель клеток животных, но вызывает у клеток GBM апоптоз. **На фиг. 21A** показано процентное изменение поглощения ^{18}F-FDG через 4 часа после обработки эрлотинибом относительно носителя в 19 глиомасферах GBM, полученных от пациентов. «Клетки с метаболической реакцией» (синие) - это образцы, которые показывают значительное снижение поглощения ^{18}F-FDG по сравнению с носителем, тогда как «клетки без метаболической реакции» (красные) не показывают значительного снижения. **На фиг. 21B** показано процентное изменение потребления глюкозы и выработки лактата за 12 часов обработки эрлотинибом относительно носителя. Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. **На фиг. 21C** показано окрашивание аннексином V клеток с метаболической реакцией (синие, n=10) или клеток без метаболической реакции (красные, n=9) после обработки эрлотинибом в течение 72 часов. **На фиг. 21D** показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома с, с последующим воздействием каждого пептида BH3 (BIM, BID или PUMA) у пациентов с метаболической реакцией или без метаболической реакции, получавших эрлотиниб в течение 24 часов. **На фиг. 21E** слева показан иммуноблот лизата цельных клеток HK301, сверхэкспрессирующих контроль GFP или GLUT1 и GLUT3 (GLUT1/3). Справа: изменения в потреблении глюкозы или выработке лактата HK301-GFP или HK301-GLUT1/3 через 12 ч. после обработки эрлотинибом. Значения относятся к контролю-носителю. **На фиг. 21F** показано использование клеток HK301-GFP или HK301-GLUT1/3. Концентрация эрлотиниба для всех экспериментов составляла 1 мкм. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

На **фиг. 22A-22H** показано связывание цитоплазматического p53 с EGFR для внутреннего апоптоза. **На фиг. 22A** показан иммуноблот указанных белков у двух клеток с метаболической реакцией (HK301 и HK336), экспрессирующих белок CRISPR/CAS9 с контрольной направляющей РНК (sgCtrl) или направляющей РНК p53 (p53KO). **На фиг. 22B** показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома с, с последующим воздействием пептида BIM в клетках sgCtrl и p53KO, обработанных эрлотинибом в течение 24 часов. **На фиг. 22C** показан иммуноблот указанных белков в HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt}. **На фиг. 22D** показана иммунофлуоресценция белка p53 в комбинации с окрашиванием DAPI для выявления локализации белка в HK301 sgCtrl, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt} (масштабные метки=20 мкм). Сначала глиомасферы были отделены от отдельных клеток и прикреплены к 96-луночным планшетам с использованием Cell-Tak (Corning) в соответствии с инструкциями производителя. Затем прикрепленные клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 10 мин., затем трижды промывали PBS. Затем клетки инкубировали с блокирующим раствором, содержащим 10% FBS и 3% BSA в PBS, в течение 1 часа, а затем инкубировали с антителом p53 (Santa Cruz, SC-126, разведение 1:50) в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки инкубировали со вторичным антителом (Alexa Fluor 647, разведение 1:2000) в течение часа и окрашиванием DAPI в течение 10 минут, затем визуализировали с помощью микроскопа Nikon TI Eclipse, оснащенного флуоресцентной камерой Cascade II (Roper Scientific). Клетки были визуализированы с излучениями при 461 нМ и 647 нМ, а затем обработаны с использованием программного обеспечения для анализа NIS-Elements AR. **На фиг. 22E** показаны изменения в указанных уровнях мРНК с последующем обработкой 100 нМ доксорубицина в течение 24 ч. в HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt}. Уровни нормализованы относительно клеток, обработанных ДМСО. **На фиг. 22F** показаны данные, аналогичные **22B**, но в HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt}. **На фиг. 22G** показаны данные, аналогичные **22E,** но в HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{R175H}, p53KO+p53^{R273H} и p53KO+p53^{NES}. **На фиг. 22H** показаны данные, аналогичные **22B** и **22F**, но в HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{R175H}, p53KO+p53^{R273H} и p53KO+p53^{NES}. Концентрация эрлотиниба для всех экспериментов составляла 1 мкм. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

На **фиг. 23A-23F** показано, как Bcl-xL предотвращает гибель клеток GBM, связываясь с цитоплазматическим p53 и секвестрируя его у клеток с метаболической реакцией на EGFRi. **На фиг. 23A** показана иммунопреципитация p53 в двух клетках с метаболической реакций (HK301 и GBM39) через 24 ч. после обработки эрлотинибом. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). **На фиг. 23B** показаны данные, аналогичные **23A**, но в двух клетках без метаболической реакции (HK393 и HK254). **На фиг. 23C** показаны данные, аналогичные **23A** и **23B**, но в HK301-GFP и HK301-GLUT1/3. Справа показаны иммуноблоты для указанных вводов. **На фиг. 23D** показана обработка HK301 в течение 24 часов эрлотинибом, WEHI-539 или обоими, и иммунопреципитацию и иммуноблоттинг выполняли, как описано ранее. **На фиг. 23E** показано окрашивание аннексином V у двух клеток с метаболической реакцией (GBM39 и HK301) и у клетки без метаболической реакции (HK393) через 72 часа после обработки эрлотинибом, WEHI-539 или обоими. **На фиг. 23F** показано окрашивание аннексином V HK301-GFP и HK301-GLUT1/3 через 72 часа после обработки эрлотинибом, wehi-539 или обоими. Концентрации эрлотиниба и WEHI-539 для всех экспериментов составляли 1 мкМ и 5 мкМ соответственно. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. *p<0,05, **p<0,01.

На **фиг. 24A-24G** показана синергическая летальность объединенного нацеливания EGFR и p53. **На фиг. 24A** показана сводная информация изменений в EGFR и генах, вовлеченных в регуляцию p53 по 273 образцам GBM. Генетические изменения в EGFR (amp/мутация) являются взаимоисключающими по сравнению с изменениями в p53. Как показано, изменения EGFR находятся в левой части таблицы, в то время как большинство изменений в p53 - справа. **На фиг. 24B** показана таблица, указывающая на значительную связь между изменениями в EGFR и генами, участвующими в пути p53. **На фиг. 24C** показано окрашивание аннексином V клетки с метаболической реакцией (слева: HK301) и клетки без реакции (справа: GS017), обработанных различными концентрациями эрлотиниба, нутлина и в комбинации, представленные в виде матрицы для титрования дозы. **На фиг. 24D** показано титрование дозы эрлотиниба и нутлина, как описано в 24C, было проведено для 10 пациентов с метаболической реакцией и 6 пациентов без реакции, и была рассчитана оценка синергизма (см. материалы и методы). **На фиг. 24E** показано окрашиваниеаннексином V HK301-GFP и HK301 GLUT1/3 через 72 часа после обработки эрлотинибом, нутлином или обоими. **На фиг. 24F** показаны аналогичные данные, как на **24E,** но в HK301-sgCtrl и HK301-p53KO. **На фиг. 24G** показано HK301, обработанной в течение 24 часов эрлотинибом, нутлином или в комбинации. Иммунопреципитацию проводили контрольным антителом иммуноглобулина G или антителом против p53, и иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). Все данные являются репрезентативными по меньшей мере для *n*=3 независимых экспериментов, среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Если не указано иное, концентрации эрлотиниба и нутлина для всех экспериментов составляли 1 мкМ и 2,5 мкМ соответственно. **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001

На **фиг. 25A-25F** показана модуляция метаболизма глюкозы, вызывающая p53-опосредованную гибель клеток у пациентов без метаболической реакции на EGFRi. **На фиг. 25A** показано процентное изменение поглощения ^{18}F-FDG через 4 часа после обработки эрлотинибом, 2DG или пиктилизибом по сравнению с носителем в HK393 и HK254. **На фиг. 25B** показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома *c*, с последующим воздействием пептида BIM в HK393 и HK254, затем эрлотиниба, 2DG или пиктилизиба в течение 24 часов. **На фиг. 25C** показаны данные, аналогичные **25B**, но в HK393 sgCtrl и p53KO. **На фиг. 25D** показана иммунопреципитация p53 в HK393 и HK254 через 24 ч. после обработки 2DG или пиктилизибом. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). **На фиг. 25E** показан показатель синергизма различных лекарственных средств (эрлотиниб, 2DG и пиктилизиб) в комбинации с нутлином HK393 и HK254. **На фиг. 25F** показано окрашивание аннексином V HK393 sgCtrl и HK393 p53KO через 72 часа после обработки 2DG, пиктилизибом, 2DG+нутлином или пиктилизибом+нутлином. Если не указано иное, концентрации эрлотиниба, 2DG, пиктилизиба и нутлина для всех экспериментов составляли 1 мкМ, 1 мМ, 1 мкМ и 2,5 мкМ соответственно. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. $^*p<0{,}05$, $^{**}p<0{,}01$, $^{***}p<0{,}001$.

На **фиг. 26A-26H** показано комбинированное нацеливание на поглощение глюкозы, вызванное EGFR, и подавление p53 роста опухоли *in vivo*. **На фиг. 26A** показана ПЭТ-КТ визуализация с помощью ^{18}F-FDG внутричерепных ксенотрансплантатов GBM39 до и после 15 часов обработки эрлотинибом (75 мг/кг). **На фиг. 26B** показаны внутричерепные ксенотрансплантаты GBM39, обработанные носителем (n=5), 75 мг/кг эрлотиниба (n=7), 50 мг/кг идасанутлина (n=5) или комбинацией ежедневно (n=12), и опухолевую массу оценивали в указанные дни с использованием секретируемой люциферазы *gaussia* (см. материалы и методы). **На фиг. 26C** показаны данные, аналогичные **26A**, но в внутричерепных ксенотрансплантатах HK393. **На фиг. 26D** показаны данные, аналогичные **26B**, но в внутричерепных ксенотрансплантатах HK393 (n=7 для всех групп). **На фиг. 25E** показан процент выживаемости для **26B**. **На фиг. 26F** показан процент выживаемости для **26C**. **На фиг. 26G** показан процент выживаемости клеток HK336 с метаболической реакцией с последующими указанными обработками в течение 25 дней и с последующим высвобождением из лекарственного средства (n=7 для всех групп). **На фиг. 26H** показан процент выживаемости клеток без метаболической реакции GS025 с последующими указанными обработками в течение 25 дней и с последующим высвобождением из лекарственного средства (n=9 для всех групп). Сравнения для **26B** и **26D** использовали наборы данных из последних измерений и были сделаны с использованием двустороннего непарного t-критерия. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. $^{**}p<0{,}01$.

На **фиг. 27A-27G** показана характеристика клеточных линий GBM после ингибирования EGFR. **На фиг. 27A** показано процентное изменение в поглощении ^{18}F-FDG в указанные моменты времени обработки эрлотиниба относительно носителя в двух клетках с метаболической реакцией (HK301 и GBM39). **На фиг. 27B** показан иммуноблот указанных белков клетки с метаболической реакцией (HK301) и клетки без метаболической реакции (HK217) после генетического нокдауна EGFR с помощью миРНК. **На фиг. 27C** показано процентное изменение в поглощении ^{18}F-FDG в HK301 и HK217 после генетического нокдауна EGFR. **На фиг. 27D** показано изменение в потреблении глюкозы с помощью 12 часов обработки эрлотинибом в трех клетках с метаболической реакцией (HK301, GBM39, HK390) и трех клетках без метаболической реакции (HK393, HK217, HK254). Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. **На фиг. 27E** показано изменение в выработке лактата с помощью 12 часов обработки эрлотинибом в трех клетках с метаболической реакцией (HK301, GBM39, HK390) и трех клетках без метаболической реакции (HK393, HK217, HK254). Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. **На фиг. 27F** показаны основные измерения ECAR двух клеток с метаболической реакцией (HK301 и GBM39, голубым цветом) и двух клеток без метаболической реакции (HK217 и HK393, красным цветом) через 12 часов после обработки эрлотинибом. **На фиг. 27G** показано изменение потребления глутамина через 12 часов после обработки эрлотинибом, измеренное с помощью анализатора Nova Biomedical BioProfile. Концентрации эрлотиниба для всех экспериментов составляли 1 мкм. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. $^{*}p<0{,}05$, $^{**}p<0{,}01$, $^{***}p<0{,}001$, $^{****}p<0{,}0001$.

На фиг. 28A-28B показаны изменения нижестоящей передачи сигналов после ингибирования EGFR, коррелирующие с метаболической реакцией. **На фиг. 28A** показан иммуноблот указанных белков через 4 часа после обработки эрлотинибом в клетках с метаболической реакцией. **На фиг. 28B** показан иммуноблот указанных белков через 4 часа после обработки эрлотинибом в клетках без метаболической реакции.

На **фиг. 29A-29B** показана генетическая характеристика клеточных линий GBM, полученных от пациентов. **На фиг. 29A** показан генетический фон на панели линий GBM. **На фиг. 29B** показана флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) HK390, HK336, HK254 и HK393, демонстрирующих полисомию *EGFR*. Флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) выполняли с использованием коммерчески доступного флуоресцентно меченного двухцветного зонда EGFR (красный)/CEP 7 (зеленый) (Abbott-Molecular). Гибридизацию и анализ FISH проводили на клеточных линиях в соответствии с протоколами, предложенными производителем. Клетки докрашивали с помощью DAPI, и сигналы флуоресцентного зонда визуализировали под флуоресцентным микроскопом Zeiss (Axiophot), оборудованным двухцветными и трехцветными фильтрами.

На **фиг. 30A-30B** показан сдвиг путем ингибирования EGFR апоптотического баланса в клетках с метаболической реакцией. **На фиг. 30A** показан иммуноблот указанных белков через 24 ч. после обработки эрлотинибом в клетках с метаболической реакцией (GBM39, HK301 и HK336) и клетках без метаболической реакции (HK217, HK393 и HK254). **На фиг. 30B** показан пример анализа динамического профилирования BH3 в клетке с метаболической реакцией (HK301). Слева: процент высвобождения цитохрома *c* измеряется после воздействия разных пептидов в указанных концентрациях. Справа: разница в высвобождении цитохрома *c* между клетками, обработанными носителем, и клетками, обработанными эрлотинибом, рассчитана для получения процента праймирования. Концентрации эрлотиниба для всех экспериментов составляли 1 мкМ.

На **фиг. 31A-31C** показана сверхэкспрессия GLUT1/3, которая восстанавливает ослабленный метаболизм глюкозы, вызванный ингибированием EGFR. **На фиг. 31A** показано изменение потребления глюкозы и выработки лактата через 12 часов после обработки эрлотинибом в HK301-GFP и HK301 GLUT1/3. Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. **На фиг. 31B** слева показан иммуноблот лизата цельных клеток GBM39, сверхэкспрессирующих GFP-контроль или GLUT1 и GLUT3 (GLUT1/3). Справа: изменения в потреблении глюкозы или выработке лактата GBM39-GFP или GBM39-GLUT1/3 через 12 ч. после обработки эрлотинибом. Значения относятся к контролю-носителю. **На фиг. 31C** показаны данные, аналогичные 35A, но в GBM39-GFP и GBM39-GLUT1/3, концентрации эрлотиниба для всех экспериментом составляли 1 мкМ. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$.

На **фиг. 32A-32I** показан цитоплазматический p53, необходимый для EGFRi-опосредованного праймирования апоптоза. **На фиг. 32A** показано процентное изменение в поглощении ^{18}F-FDG через 4 часа после обработки эрлотинибом в клетках HK301 sgCtrl и p53 KO (среднее ± s.d., n=3). **На фиг. 32B** показаны относительные уровни мРНК p53-регулируемых генов через 24 часа после обработки 1 мкМ эрлотиниба или 100 нМ доксорубицина в HK301 (клетка с метаболической реакцией). **На фиг. 32C** показаны клетки HK301, инфицированные репортерной системой p53-люцифераза, и активность p53 измеряли через 24 часа после обработки 1 мкМ эрлотиниба (среднее ± s.d., n=3). Результаты представляют два независимых эксперимента. **На фиг. 32D** показан иммуноблот указанных белков в HK336 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt}. **На фиг. 32E** показана иммунофлуоресценция белка p53 в комбинации с окрашиванием DAPI для выявления локализации белка в HK336 sgCtrl, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt} (масштабные метки=20 мкм). Иммунофлуоресценцию проводили, как описано выше. **На фиг. 32F** показаны изменения в указанных уровнях мРНК с последующем обработкой 100 нМ доксорубицина в течение 24 ч. в HK336 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt} (среднее значение ± s.d., n=3). Уровни нормализованы относительно клеток, обработанных ДМСО. **На фиг. 32G** показано процентное изменение в праймировании апоптоза относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома с последующим воздействием пептида BIM, в клетках HK336 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt}, обработанных эрлотинибом в течение 24 часов. (среднее ± s.d., n=2). Результаты представляют два независимых эксперимента. **На фиг. 32H** показан иммуноблот указанных белков в HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{R175H}, p53KO+p53^{R273H} и p53KO+p53^{NES}. **На фиг. 32I** показано процентное изменение праймирования в HK301 через 24 ч. после обработки эрлотинибом с или без предварительной обработки PFTμ (10 мкМ в течение 2 часов) (среднее ± s.d., n=2). Результаты представляют два независимых эксперимента.

На **фиг. 33A-33D** показано ингибирование EGFR-вызванного метаболизма глюкозы, индуцирующего зависимость Bcl-xL через функции цитоплазматического p53. **На фиг. 33A** показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома *c* с последующим воздействием пептидов BAD и HRK в клетках с метаболической реакцией (HK301 и HK336) или клетке без метаболической реакции (HK229), обработанных эрлотинибом. **На фиг. 33B** слева показана иммунопреципитация p53 в GBM39-GFP и GBM39-GLUT1/3 через 24 часа после обработки эрлотинибом. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Справа приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). **На фиг. 33C** показано окрашивание аннексином V HK301 (слева) и HK336 (справа) sgCtrl, p53KO, p53 KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt} через 72 часа после обработки эрлотинибом, WEHI-539 или комбинацией. **На фиг. 33D** показаны данные, аналогичные **33C**, но в GBM39-GFP и GBM39-GLUT1/3, концентрации эрлотиниба и WEHI-539 для всех экспериментов составляли 1 мкМ. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

На **фиг. 34A-34H** показано ингибирование EGFR-регулируемого метаболизма глюкозы, а активация p53 способствует внутреннему апоптозу в GBM**. На фиг. 34A** показан иммуноблот указанных белков через 24 часа после обработки эрлотинибом, нутлином или комбинацией в двух клетках с метаболической реакцией (HK301 и GBM39). **На фиг. 34B** показано окрашивание аннексином V в HK301 и HK217 после генетического нокдауна EGFR и последующей обработки нутлином в течение 72 часов. **На фиг. 34C** показано обнаружение олигомеризации BAX в HK301-GFP и HK301-GLUT1/GLUT3, Через 24 часа после указанной обработки клетки собирали и инкубировали в 1 мМ BMH для стимулирования перекрестного связывания белков и проводили иммуноблоттинг с указанными антителами. Ниже BAX представляет собой иммуноблот для цитозольного цитохрома *c* после клеточного фракционирования. **На фиг. 34D** сверху показан иммуноблот указанных белков в HK301-GFP и HK301-HA-BclxL. Снизу: окрашивание аннексином V в HK301-GFP и HK301-HA-BclxL через 72 часа после обработки эрлотинибом, нутлином или комбинацией. **На фиг. 34E** показано окрашивание аннексином V HK301 через 72 часа предварительной обработки +/- PFTμ эрлотинибом, нутлином или комбинацией (10 мкМ в течение 2 часов). **На фиг. 34F** показано окрашивание аннексином V HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{R175H}, p53KO+p53^{R273H} и p53KO+p53^{NES} через 72 часа после обработки эрлотинибом, нутлином или комбинацией. **На фиг. 34G** показаны данные, аналогичные **34F**, но в HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt}. Концентрации лекарственных средств для всех экспериментов следующие: эрлотиниб (1 мкМ), нутлин (2,5 мкМ). Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. **На фиг. 34H** показаны данные, аналогичные **34G**, но в HK336 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53^{cyto} и p53KO+p53^{wt}. Концентрации лекарственных средств для всех экспериментов следующие: эрлотиниб (1 мкМ), нутлин (2,5 мкМ). Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$, ****$p<0,0001$.

На **фиг. 35A-35F** показано способствование ингибирования метаболизма глюкозы у пациентов с метаболической реакцией и пациентов без метаболической реакции внутреннему апоптозу. **На фиг. 35A** показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома *c*, с последующим воздействием пептидов BIM в клетке с метаболической реакцией HK301 через 24 часа после обработки эрлотинибом или 2DG. **На фиг. 35B** слева показана: иммунопреципитация p53 в HK301 через 24 часа после обработки с помощью 2DG. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Справа приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). **На фиг. 35C** показаны измерения OCR и ECAR клеток HK301 после воздействия олигомицина и ротенона. **На фиг. 35D** показано окрашивание аннексином V в HK301 через 72 часа после обработки нутлином, эрлотинибом, 2DG, олигомицином, ротеноном в качестве отдельных средств или в комбинации с нутлином. **На фиг. 35E** показан иммуноблот указанных белков через 4 часа после обработки эрлотинибом или пиктилизибом в двух клетках без метаболической реакции (HK254 и HK393). **На фиг. 35F** показана иммунопреципитация p53 в HK254 через 24 часа после обработки пиктилизибом или 2DG. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). Концентрации лекарственных средств для всех экспериментов следующие: эрлотиниб (1 мкМ), нутлин (2,5 мкМ), 2DG (3 мМ для HK301 и 1 мМ для HK254), олигомицин (1 мкМ), ротенон (1 мкМ) и пиктилизиб (1 мкМ). Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. ****$p<0,0001$.

На **фиг. 36A-36D** показана *In vivo* эффективность ингибирования EGFR и активации p53. **На фиг. 36A** показаны концентрации идасанутлина в головном мозге и плазме в указанные моменты времени (n=2 мыши/момент времени) у мышей, не несущих опухоль. **На фиг. 36B** показан иммуногистохимический (ИГХ) анализ экспрессии p53 в ксенотрансплантатах, несущих внутричерепную опухоль, после 36-часовой обработки идасанутлином (50 мг/кг). **На фиг. 36C** показано процентное изменение поглощения ^{18}F-FDG через 15 часов после обработки эрлотинибом во внутричерепных ксенотрансплантатах GBM39 (n=3) и HK393 (n=5). **На фиг. 36D** показано изменение массы тела мышей после ежедневной обработки эрлотинибом (75 мг/кг) или комбинацией эрлотиниба (75 мг/кг) и идасанутлина (50 мг/кг). Все обработки проводили перорально. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. *$p<0,05$.

На фиг. 37A показано, что прямое ингибирование гликолиза с помощью 2DG (ингибитор гексокиназы) или цитохалазина B (ингибитор переносчика глюкозы) неожиданно действует синергически с активацией p53 (с нутлином). **На фиг. 37B** показано, что низкий уровень глюкозы (0,25 мМ) приводит к синергической гибели клеток путем ингибирования BCL-xL навитоклаксом (ABT-263). **На фиг. 37C** показано, что низкий уровень глюкозы (0,25 мМ) приводит к синергической гибели клеток путем ингибирования BCL-xL нутлином.

На фиг. 38 показано сравнение между пациентами с метаболической реакцией на ингибитор EGFRi, эрлотиниб, и пациентами без метаболической реакции. Комбинация эрлотиниба и нутлина приводит к неожиданной синергической синтетической летальности у пациентов с метаболической реакцией, но не у пациентов без метаболической реакции.

На фиг. 39A показана энантиомерная чистота синтетического промежуточного соединения **5,** как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH). **На фиг. 39B** показана энантиомерная чистота синтетического промежуточного соединения **(S)-5,** как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH). **На фиг. 39C** показана энантиомерная чистота синтетического промежуточного соединения **(R)-5,** как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH). **На фиг. 39D** показана энантиомерная чистота производных эфира Мошера **5,** как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH).

На фиг. 40 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, гефитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против U87 EGFRwt.

На фиг. 41 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, гефитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против U87 EGFRviii.

На фиг. 42 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, гефитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против HK301, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 43 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, гефитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против GBM39, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 44 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFRvIII мышиной модели GBM39.

На фиг. 45A показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFR клеточной линии рака легкого HCC827. **На фиг. 45B** показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFR клеточной линии рака легкого PC9. **На фиг. 45C** показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной клеточной линии рака легкого H838.

На фиг. 46 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFR мышиной модели рака легкого PC9.

На фиг. 47 показаны определенные метаболиты иллюстративных соединений по изобретению.

На фиг. 48A показана активность иллюстративных соединений по изобретению против HK301.

На фиг. 48B показана активность иллюстративных соединений по изобретению против GBM39. **На фиг. 48C** показана активность иллюстративных соединений по изобретению против NHA.

На фиг. 49A показаны характеристики ADME иллюстративного соединения согласно настоящему изобретению на крысах после введения PO.

На фиг. 49B показаны характеристики ADME иллюстративного соединения согласно настоящему изобретению на крысах после введения PO.

На фиг. 50A показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т. е. лабпатиниб, эрлотиниб, гефитиниб и AZD3759) против HK301, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 50B показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т. е. лабпатиниб, эрлотиниб, гефитиниб и AZD3759) против HK301, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 51A показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т. е. лабпатиниб, эрлотиниб, гефитиниб и AZD3759) против GBM39, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM. **На фиг. 51B** показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т. е. лабпатиниб, эрлотиниб, гефитиниб и AZD3759) против GBM39, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 52A показана активность озимертиниба и JGK068S против pEGFRwt. На **фиг. 52B** показана активность орзиметиниба и JGK068S против pEGFRvIII.

На фиг. 53A показана активность озимертиниба и JGK068S против HK301. На **фиг. 53B** показана активность орзиметиниба и JGK068S против GBM39.

На фиг. 54A показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против определенных мутантов EGFR. **На фиг. 54B** показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR A263P. **На фиг. 54C** показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR A289V. **На фиг. 54D** показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR A289D. **На фиг. 54E** показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR G598V.

Подробное описание изобретения

Глиомы являются наиболее часто встречающейся формой опухоли головного мозга, причем мультиформная глиобластома (GBM) является наиболее злокачественной формой, вызывая 3-4% всех смертей, связанных с раком (Louis et al. (2007) *Acta. Neuropathol.* 114: 97-109.). Всемирная организация здравоохранения определяет GBM как рак IV степени, характеризуемый как злокачественный, митотически активный и предрасположенный к некрозу. У GBM очень плохой прогноз: 5-летняя выживаемость составляет 4-5%, а средняя выживаемость GBM составляет 12,6 месяцев (McLendon et al. (2003) *Cancer.* 98:1745-1748.).

Это можно объяснить уникальными ограничениями лечения, такими как высокий средний возраст начала, локализация опухоли и плохое понимание патофизиологии опухоли (Louis et al. (2007) *Acta. Neuropathol.* 114: 97-109).Лечение GBM включает резекцию опухоли с одновременной лучевой терапией и химиотерапией, и в последние годы было несколько заметных улучшений, которые увеличивают выживаемость (Stewart, et al. (2002) *Lancet.* 359:1011-1018.).

Стандарт для химиотерапии GBM - это темозоломид (TMZ), который представляет собой проникающий в мозг алкилирующий агент, который метилирует пурины (A или G) в ДНК и вызывает апоптоз (Stupp, et al. (2005) *N. Engl. J. Med.* 352:987-996). Однако использование TMZ имеет недостатки в том, что значительный риск возникает из-за повреждения ДНК в здоровых клетках, и что клетки GBM могут быстро развить устойчивость к лекарственному средству (Carlsson, et al. (2014) *EMBO. Mol. Med.* 6: 1359-1370). Поэтому срочно требуются дополнительные варианты химиотерапии.

EGFR представляет собой член суперсемейства HER рецепторных тирозинкиназ вместе с ERBB2, ERBB3 и ERBB4. Распространенным фактором прогрессирования GBM является накопление EGFR, которое обнаруживается почти в 40% всех случаев GBM (Hynes et al. (2005) *Nat. Rev. Cancer.* 5: 341-354; Hatanpaa et al. (2010) *Neoplasia.* 12:675-684). Кроме того, накопление EGFR связано с присутствием вариантов белка EGFR: в 68% мутантов EGFR; имеется делеция в N-концевой лиганд-связывающей области между аминокислотами 6 и 273. Эти делеции в лиганд-связывающих доменах EGFR могут приводить к лиганд-независимой активации EGFR (Yamazaki et al. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 773-779.).

Низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы (TKI) являются наиболее клинически продвинутыми из терапевтических средств, нацеленных на EGFR, и как обратимые, так и необратимые ингибиторы проходят клинические испытания. Примеры обратимых ингибиторов и необратимых ингибиторов включают эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб, PKI166, канертиниб и пелитиниб (Mischel et al. (2003) *Brain Pathol.* 13: 52-61). Машинально эти TKI конкурируют с АТФ за связывание с тирозинкиназным доменом EGFR, однако эти EGFR-связанные ингибиторы тирозинкиназы были относительно неэффективны против глиом, при этом частота ответа достигала 25% в случае эрлотиниба (Mischel et al. (2003) *Brain Pathol.* 13: 52-61; Gan et al. (2009) *J. Clin. Neurosci.* 16: 748-54). Хотя TKI хорошо переносятся и проявляют некоторую противоопухолевую активность у пациентов с GBM, повторяющаяся проблема устойчивости к ингибированию рецепторов ограничивает их эффективность (Learn et al. (2004) *Clin. Cancer. Res.* 10: 3216-3224; Rich et al. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 430-446). Кроме того, недавние исследования показали, что концентрации гефитиниба и эрлотиниба в плазме крови головного мозга после терапии составляли всего 6-11% от начальной дозы, что позволяет предположить, что эти соединения могут не преодолевать гематоэнцефалический барьер, как показано в таблице 1 (Karpel-Massler et al. (2009) *Mol. Cancer Res.* 7:1000-1012). Таким образом, недостаточная доставка к мишени может быть еще одной причиной неутешительных клинических результатов.

Таблица 1. Скорость проникновения в мозг медицинских препаратов действующего стандарта

Соединение	Первичное	Дневная доза	Плазма крови (нг/мл)	CSF (нг/мл)	Скорость проникновения в головной мозг (%)
Афатиниб	EGFR-мутант NSCLC	50	66,7	0,46	0,7
Алектиниб	ALK-мутант NSCLC	1200	1,5 (несвязанная конц.)	1,3	86,7
Кризотиниб	ALK-мутант NSCLC	500	237	0,616	0,26
Эрлотиниб	EGFR-мутант NSCLC EGFR-мутант NSCLC	150 1500 (еженедельно)	1140 ± 937 4445,9	28,7 ± 16,8 51,1	2,77 ±0,45 1,2
Гефитиниб	EGFR-мутант NSCLC EGFR-мутант NSCLC	250 750-1000	326 ± 116 1345,9-5094,4	3,7 ± 1,9 14,7-143,1	1,13 ±0,36 1,07-3,58
Лапатиниб	HER2+рак молочной железы	1250	1515, 3472	1,3, 4,5	0,09, 0,13

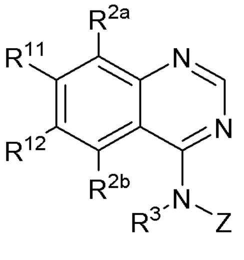
В свете этих данных остается неудовлетворенной клиническая потребность в сильнодействующих ингибиторах тирозинкиназы, которые обладают способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер и лечить, ингибируя EGFR и его изоформы.

Кроме того, авторы изобретения показали, что перекрестная связь между онкогенными сигнальными и метаболическими путями создает возможности для новых комбинированных терапий при GBM. Более конкретно, авторы изобретения обнаружили, что острое ингибирование поглощения глюкозы, вызванного EGFR, вызывает минимальную гибель клеток, но снижает порог апоптоза в клетках GBM, полученных от пациента, и «примирует» клетки для апоптоза. Неожиданно исследования механизма действия авторов изобретения показали, что Bcl-xL блокирует цитоплазматический p53 от запуска внутреннего апоптоза, что приводит к выживанию опухоли. Фармакологическая стабилизация p53 (например, с помощью проникающей в мозг небольшой молекулы идасанутлина) позволяет p53 задействовать внутренний механизм апоптоза, способствуя взаимоусиливающей летальности с нацеленным EGFR-вызванным поглощением глюкозы в ксенотрансплантатах GBM. Примечательно, что авторы изобретения также обнаружили, что быстрые изменения в поглощении ^{18}F-фтордезоксиглюкозы (^{18}F-FDG), используя, например, неинвазивную позитронно-эмиссионную томографию, можно предсказать чувствительность к комбинации *in vivo*.

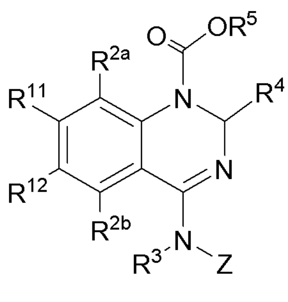
Авторы изобретения, среди прочего, идентифицируют критическую связь между передачей сигналов онкогенов, метаболизмом глюкозы и цитоплазматическим p53, которая может быть использована для комбинированной терапии при GBM и других злокачественных новообразованиях.

Соединения по изобретению

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены соединения Формулы I или Формулы I*:



(I)



(I*)

или их фармацевтически приемлемая соль, где:

Z представляет собой арил или гетероарил;

каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из водорода, алкила, галогена, CN и NO_2;

R^3 представляет собой водород, алкил или ацил;

R^4 представляет собой алкокси;

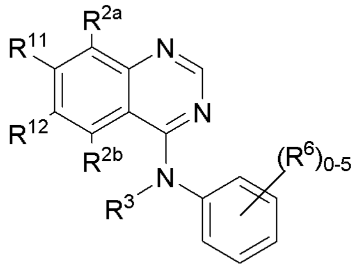
R^5 представляет собой алкил; каждый из R^7 и R^8 независимо выбран из водорода, алкила, такого как алкоксиалкил, аралкил или арилацил;

R^{11} представляет собой водород, алкил, галоген, CN, NO_2, OR^7, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; и

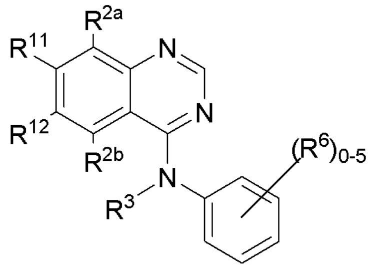
R^{12} представляет собой водород, алкил, галоген, CN, NO_2, OR^8, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; или R^{11} и R^{12}, взятые вместе, образуют карбоциклическое или гетероциклическое кольцо.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления Формулы I или Формулы I* по меньшей мере один из R^{2a} и R^{2b} не представляет собой H. В определенных таких вариантах осуществления Формулы I или Формулы I*, если R^{2a} представляет собой водород, R^{2b} выбран из алкила, галогена, CN и NO_2. В других таких вариантах осуществления Формулы I или Формулы I*, если R^{2b} представляет собой водород, R^{2a} выбран из алкила, галогена, CN и NO_2.

В определенных вариантах осуществления Формулы I или Формулы I* соединение представляет собой соединение Формулы (IVa) или Формулы (IVb):



(IVa)



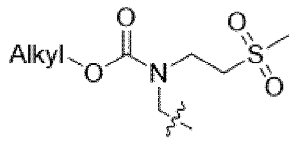
(IVb),

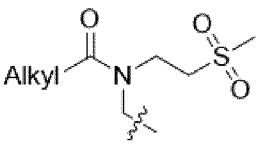
или его фармацевтически приемлемая соль, где

в каждом случае R^6 независимо выбран из алкила, алкокси, OH, CN, NO_2, галогена, алкенила, алкинила, аралкилокси, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила.

В определенных вариантах осуществления Формулы I, I*, Iva и IVb R^{11} представляет собой водород. В других предпочтительных вариантах осуществления R^{11} представляет собой OR^7.

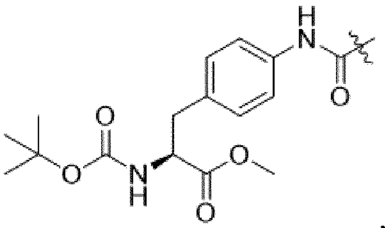
В определенных вариантах осуществления Формулы I, I*, Iva и IVb R^7 представляет собой водород. В других вариантах осуществления R^7 представляет собой алкил. В еще других вариантах осуществления R^7 представляет собой алкоксиалкил. В еще других вариантах осуществления R^7 представляет собой арилацил.

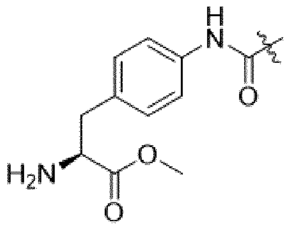
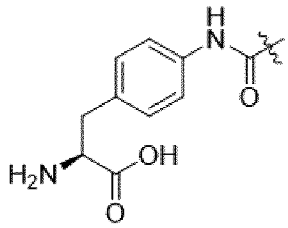
В определенных вариантах осуществления Формулы I, I*, Iva и IVb R^{12} представляет собой гетероарил, такой как фуранил. В определенных вариантах осуществления гетероарил замещен алкилом, алкокси, OH, CN, NO_2, галогеном, 

или 

. В других предпочтительных вариантах осуществления R^{12} представляет собой OR^8.

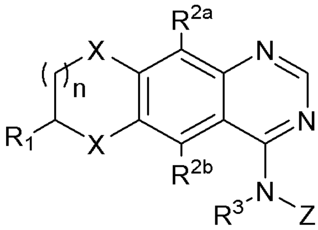
В определенных вариантах осуществления Формулы I, I*, Iva и IVb R^8 представляет собой водород. В других вариантах осуществления R^8 представляет собой алкил. В еще других вариантах осуществления R^8 представляет собой алкоксиалкил. В определенных вариантах осуществления R^8 представляет собой алкил, замещенный



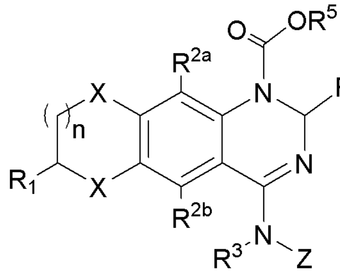
,  или  .

В определенных предпочтительных вариантах осуществления Формулы I, I*, Iva и IVb R^{11} и R^{12} объединены с образованием карбоциклического или гетероциклического кольца, такого как 5-членное, 6-членное или 7-членное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо. В определенных вариантах осуществления карбоциклическое или гетероциклическое кольцо замещено гидроксилом, алкилом (например, метилом) или алкенилом (например, винилом).

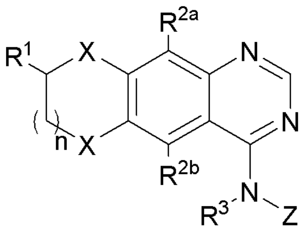
В определенных вариантах осуществления Формулы I, I*, Iva и IVb соединение представляет собой соединение Формулы Ia, Ib, Ic или Id:



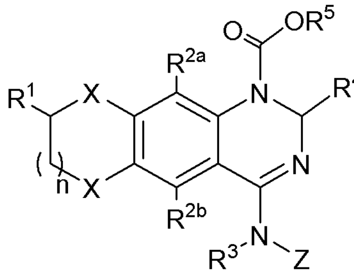
(Ia)



(Ib)



(Ic)



(Id)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

X представляет собой O, S или NH;

Z представляет собой арил или гетероарил;

R^1 представляет собой водород или алкил;

каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из водорода, алкила, галогена, CN и NO_2;

R^3 представляет собой водород, алкил или ацил;

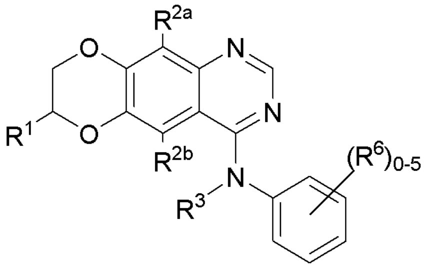
R^4 представляет собой алкокси;

R^5 представляет собой алкил; и

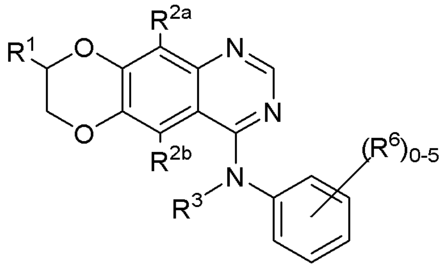
n равно 0-3.

В определенных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic или Id или R^{2a}, или R^{2b} выбран из алкила, галогена, CN и NO_2. В определенных предпочтительных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic или Id Z представляет собой фенил. В определенных предпочтительных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic или Id X представляет собой O. В определенных предпочтительных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic или Id n равно 1.

В определенных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic или Id соединение представляет собой соединение Формулы (IIa) или Формулы (IIb):



(IIa)

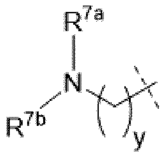


(IIb)

или фармацевтически приемлемая соль, где:

в каждом случае R^6 независимо выбран из алкила, алкокси, OH, CN, NO_2, галогена, алкенила, алкинила, аралкилокси, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила.

В определенных вариантах осуществления, где R^1 представлен Формулой A:



(A),

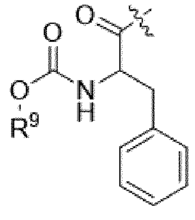
где,

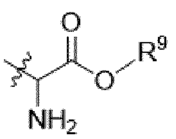
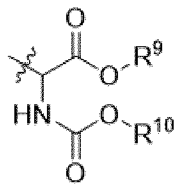
каждый из R^{7a} и R^{7b} независимо выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила; или R^{7a} и R^{7b} объединены с образованием гетероциклила; и

y равно 0-3.

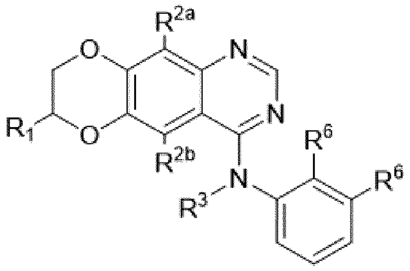
В определенных вариантах осуществления Формулы IIa или IIb R^1 представляет собой алкил (например, метил или этил). В определенных вариантах осуществления R^1 замещен гетероциклилом (например, морфолинил, пиперидинил, пирролодинил или пиперазинил, такой как N-метилпиперазинил). В других вариантах осуществления R^1 замещен амино (например, диметиламино). В других вариантах осуществления R^1 представляет собой алкил, замещенный гидроксилом. В определенных предпочтительных вариантах осуществления R^1 находится в *S*-конфигурации. В других вариантах осуществления R^1 находится в *R*-конфигурации.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления Формулы IIa или IIb

R^3 представляет собой водород. В других вариантах осуществления R^3 представляет собой ацил. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой алкилацил. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой алкилоксиацил. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой ацилоксиалкил. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой  ; и R^9 представляет собой алкил.

В определенных вариантах осуществления Формулы IIa или IIb Z представляет собой арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими R^6; и в каждом случае R^6 независимо выбран из алкила, алкокси, OH, CN, NO_2, галогена, алкенила, алкинила, аралкилокси, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила. В определенных предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой фенил, замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 R^6. В определенных вариантах осуществления каждый R^6 независимо выбран из галогена, алкила, алкинила или арилалкокси. В еще более предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой 2-фтор-3-хлорфенил, 2-фторфенил, 2,3-дифторфенил, 2,4-дифторфенил, 2,5-дифторфенил, 2,6-дифторфенил, 2,4,6-трифторфенил, пентафторфенил, 2-фтор-3-бромфенил, 2-фтор-3-этинилфенил и 2-фтор-3-(трифторметил)фенил. В других еще более предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой 3-этинилфенил. В других еще более предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой 3-хлор-4-((3-фторбензил)окси)бензол. В других еще более предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой 3-хлор-2-(трифторметил)фенил. В других еще более предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой 3-бромфенил. В других еще более предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой 2-фтор,5-бромфенил. В других еще более предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой 2,6-дифтор,5-бромфенил. В определенных вариантах осуществления Z замещен одним R^6, выбранным из  или  ; и R^9 и R^{10} независимо выбраны из алкила.

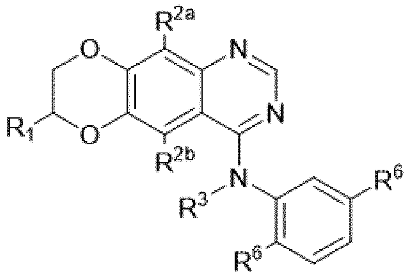
В определенных вариантах осуществления Формулы IIIa или IIIb соединение представляет собой соединение Формулы (IIIa):



(IIIa),

и каждый R^6 независимо выбран из фтора, хлора или брома.

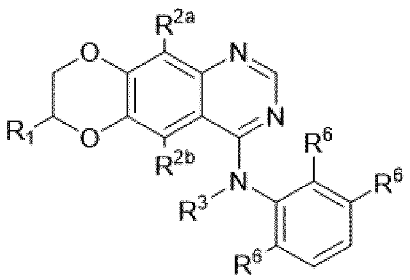
В определенных вариантах осуществления Формулы IIIa или IIIb соединение представляет собой соединение Формулы (IIIb):



(IIIb),

и каждый R^6 независимо выбран из фтора, хлора или брома.

В определенных вариантах осуществления Формулы IIIa или IIIb соединение представляет собой соединение Формулы (IIIc):

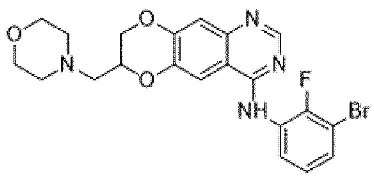


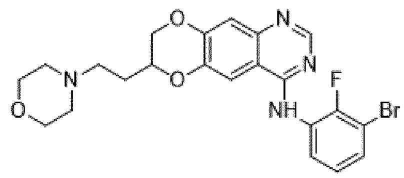
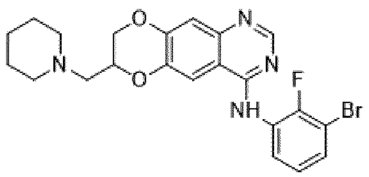
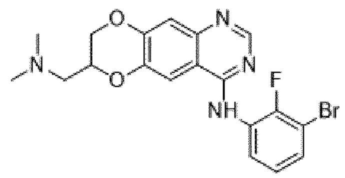
(IIIc),

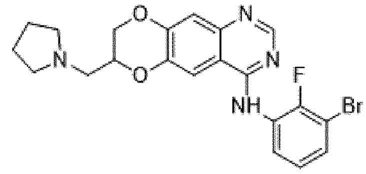
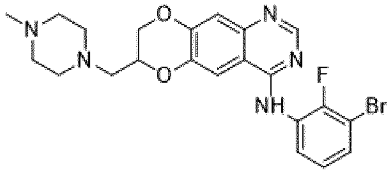
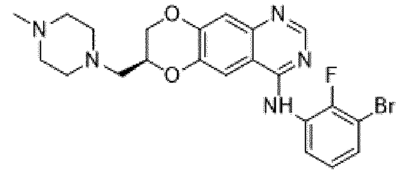
и каждый R^6 независимо выбран из фтора, хлора или брома.

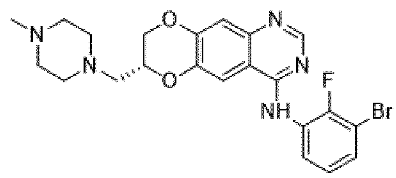
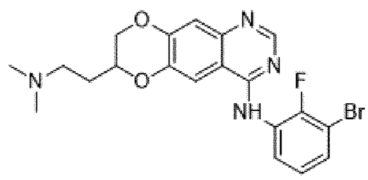
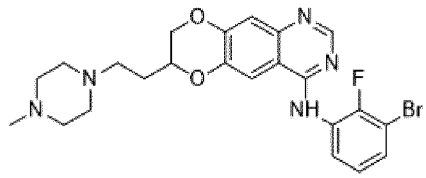
В определенных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb или IIIc R^{2a} представляет собой галоген (например, фтор). В других предпочтительных вариантах осуществления R^{2a} представляет собой водород.

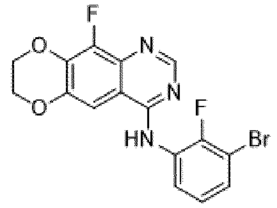
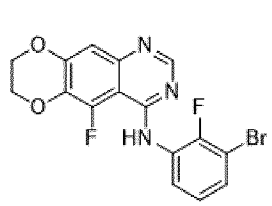
В определенных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb или IIIc R^{2b} представляет собой галоген (например, фтор). В других предпочтительных вариантах осуществления R^{2b} представляет собой водород.

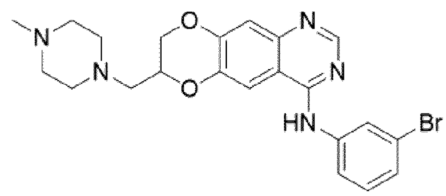
В определенных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb или IIIc соединение представляет собой  ,

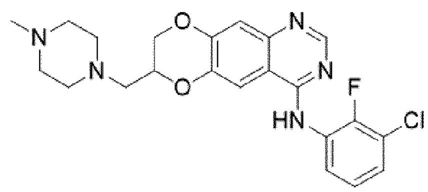
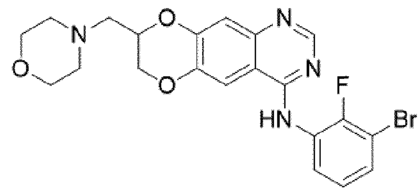
  ,  ,

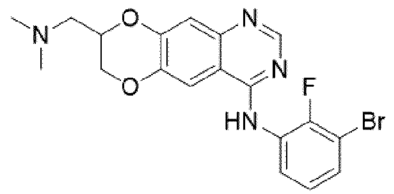
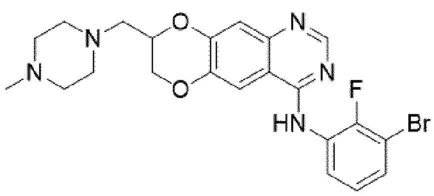
 ,  ,  ,

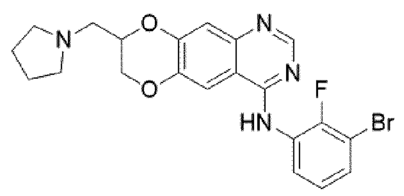
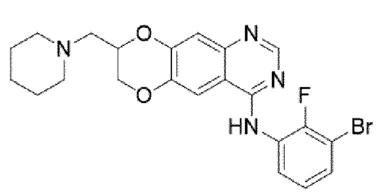
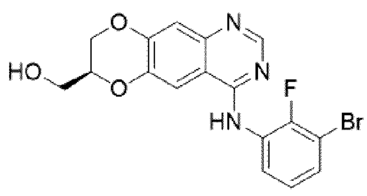
 ,  ,  ,

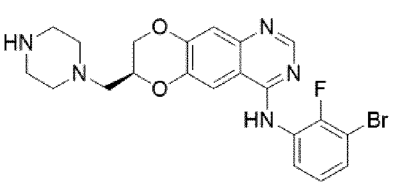
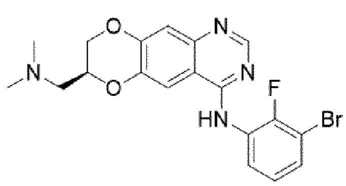
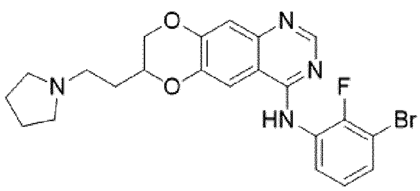
 или  ; или его фармацевтически приемлемая соль.

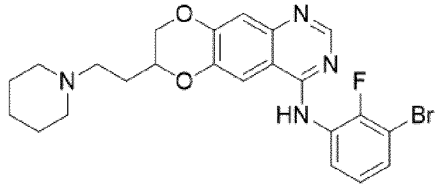
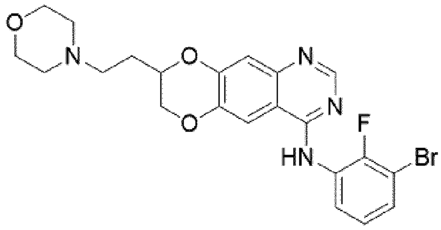
В определенных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb или IIIc соединение представляет собой  ,

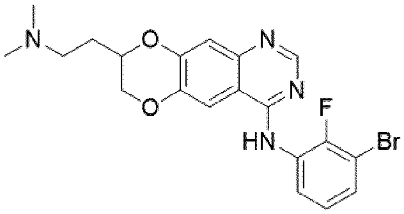
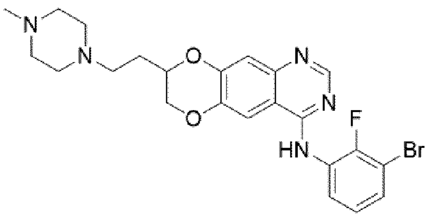
 ,  ,

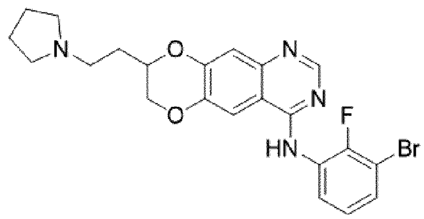
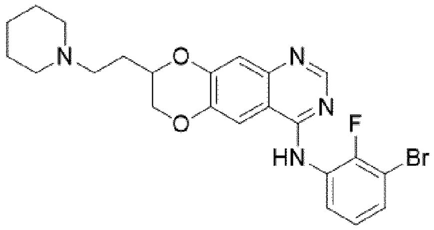
 ,  ,

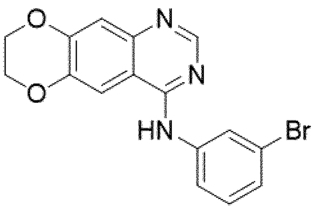
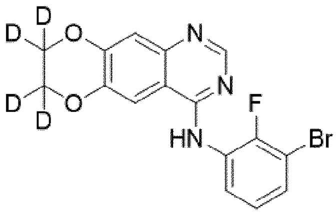
 ,  ,  ,

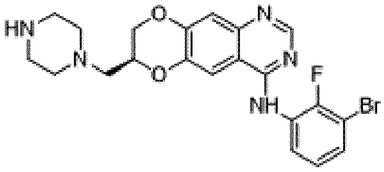
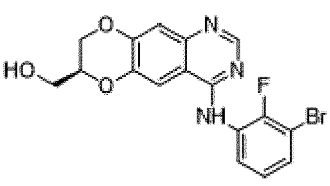
,
,
,

,
,

,
,

 и ; или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных вариантах осуществления Формулы I соединение представляет собой  или ; или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных вариантах осуществления Формулы Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb или IIIc соединение представляет собой  или ; или его фармацевтически приемлемая соль.

Способы лечения

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования EGFR или ΔEGFR, включающие введение субъекту количества соединения по изобретению.

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении рака, количества соединения по изобретению. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга, рак груди, рак сердца, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак пищевода, фибросаркому, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы, позвоночника и шеи, саркому Капоши, рак почки, лейкемию, рак печени, лимфому, меланому, множественную миелому, рак поджелудочной железы, рак полового члена, рак половых клеток яичек, карциному тимомы, карциному тимуса, рак легких, рак яичников или рак простаты. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой глиому, астроцитому или глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому. В определенных вариантах осуществления способ снижает пролиферацию раковых клеток.

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту ингибитора метаболизма глюкозы и дополнительного средства, при этом метаболизм глюкозы представляет собой соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и дополнительное средство представляет собой цитоплазматический стабилизатор p53. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга, рак груди, рак сердца, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак пищевода, фибросаркому, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы, позвоночника и шеи, саркому Капоши, рак почки, лейкемию, рак печени, лимфому, меланому, множественную миелому, рак поджелудочной железы, рак полового члена, рак половых клеток яичек, карциному тимомы, карциному тимуса, рак легких, рак яичников или рак простаты. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой глиому, астроцитому или глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому. В определенных вариантах осуществления способ снижает пролиферацию раковых клеток. В определенных вариантах осуществления рак является рецидивирующим или резистентным. В других вариантах осуществления рак ранее не лечился.

В определенных вариантах осуществления субъект был определен как восприимчивый к ингибитору метаболизма глюкозы с помощью способа, включающего:

a. получение первого образца крови от субъекта;

b. перевод субъекта на кетогенную диету;

c. получение второго образца крови у субъекта после того, как его поместили на кетогенную диету в течение определенного периода времени;

d. измерение уровня глюкозы в первом и втором образцах крови;

e. сравнение уровня глюкозы во втором образце крови с уровнем глюкозы в первом образце крови; и

f. определение того, что субъект является восприимчивым, если уровень глюкозы во втором образце крови снижен по сравнению с уровнями глюкозы в первом образце крови.

В определенных вариантах осуществления снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови составляет около или более 0,15 мМ. В определенных вариантах осуществления снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови составляет около или более 0,20 мМ. В определенных вариантах осуществления снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови находится в диапазоне от 0,15 мМ до 2,0 мМ. В определенных вариантах осуществления снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови находится в диапазоне от 0,25 мМ до 1,0 мМ.

В определенных вариантах осуществления цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор MDM2. В определенных вариантах осуществления ингибитор MDM2 представляет собой нутлин. В определенных вариантах осуществления ингибитор MDM2 представляет собой нутлин-3 или идасанутлин. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят от 50 мг до 1600 мг идасанутлина. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 100 мг идасанутлина. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 150 мг идасанутлина. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 300 мг идасанутлина. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 400 мг идасанутлина. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 600 мг идасанутлина. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 1600 мг идасанутлина. В других вариантах осуществления ингибитор MDM2 представляет собой RO5045337, RO5503781, RO6839921, SAR405838, DS-3032, DS-3032b или AMG-232.

В определенных вариантах осуществления цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор BCL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор BCL-2 представляет собой антисмысловой олигодезоксинуклеотид G3139, антагонист мРНК SPC2996, венетоклакс (ABT-199), GDC-0199, обатоклакс, паклитаксел, навитоклакс (ABT-263), ABT-737, NU-0129, S 055746 или APG-1252.

В определенных вариантах осуществления цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор Bcl-xL. В определенных вариантах осуществления ингибитор Bcl-xL представляет собой WEHI 539, ABT-263, ABT-199, ABT-737, сабутоклакс, AT101, TW-37, APG-1252 или гуммигутовую кислоту.

В определенных вариантах осуществления ингибитор метаболизма глюкозы и цитоплазматический стабилизатор p53 вводят в одной и той же композиции. В других вариантах осуществления ингибитор метаболизма глюкозы и цитоплазматический стабилизатор p53 вводят в отдельных композициях.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает применение дополнительной терапии.

Типы и стадии глиом

Первичные злокачественные опухоли головного мозга представляют собой опухоли, которые начинаются в головном или спинном мозге и называются глиомами. Глиомы не являются особым типом рака, это термин, используемый для описания опухолей, происходящих из глиальных клеток. Примеры первичных злокачественных опухолей головного мозга включают астроцитомы, пилоцитарные астроцитомы, плеоморфные ксантоастроцитомы, диффузные астроцитомы, анапластические астроцитомы, GBM, ганглиоглиомы, олигодендроглиомы, эпендимомы. Согласно классификации опухолей головного мозга ВОЗ астроцитомы подразделяются на четыре степени в зависимости от основной патологии. Характеристики, которые используются для классификации глиом, включают митозы, клеточную или ядерную атипию, а также пролиферацию и некроз сосудов с псевдоогораживающими признаками. Злокачественные (или высокозлокачественные) глиомы включают анапластическую глиому (степень III по ВОЗ), а также мультиформную глиобластому (GBM; IV степень по классификации ВОЗ). Это самые агрессивные опухоли головного мозга с наихудшим прогнозом.

GBM - это наиболее распространенный, сложный, устойчивый к лечению и самый смертоносный тип рака мозга, на который приходится 45% всех случаев рака мозга, при этом ежегодно диагностируется почти 11000 мужчин, женщин и детей. GBM (также известная как астроцитома 4 степени и мультиформная глиобластома) является наиболее распространенным типом злокачественных первичных опухолей головного мозга. Они чрезвычайно агрессивны по ряду причин. Во-первых, клетки глиобластомы быстро размножаются, так как выделяют вещества, стимулирующие обильное кровоснабжение. У них также есть способность вторгаться и проникать на большие расстояния в здоровый мозг, посылая микроскопические усики опухоли вместе с здоровыми клетками. Известны два типа глиобластом. Первичная GBM - наиболее распространенная форма; они быстро растут и часто рано вызывают симптомы. Вторичные глиобластомы встречаются реже, составляя около 10 процентов всех GBM. Они прогрессируют от диффузной астроцитомы низкой степени злокачественности или анапластической астроцитомы и чаще встречаются у более молодых пациентов. Вторичные GBM преимущественно располагаются в лобной доле и имеют лучший прогноз.

GBM обычно лечат комбинированным мультимодальным планом лечения, включающим хирургическое удаление опухоли, лучевую терапию и химиотерапию. Во-первых, во время операции удаляется как можно больше опухоли. Расположение опухоли в головном мозге часто определяет, насколько ее можно безопасно удалить. После операции лучевая терапия и химиотерапия замедляют рост оставшихся опухолевых клеток. Пероральный химиотерапевтический препарат темозоломид чаще всего используется в течение шести недель, а затем ежемесячно. Другое лекарственное средство, бевацизумаб (известный как Avastin®), также используется во время лечения. Это лекарственное средством блокирует способность опухоли провоцировать кровоснабжение, часто замедляя или даже останавливая рост опухоли.

Также используются новые исследовательские методы лечения, которые могут включать добавление лечения к стандартной терапии или замену одной части стандартной терапии другим лечением, которое может работать лучше. Некоторые из этих методов лечения включают иммунотерапию, такую как иммунотерапия вакцинами, или импульсы электричества с низкой дозой в область мозга, где находится опухоль, и нанотерапию с использованием сферических нуклеиновых кислот (SNA), таких как NU-0129. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются в комбинации с одним или несколькими из вышеупомянутых методов лечения.

Варианты способов и композиций, обсуждаемых в настоящем документе, также рассматриваются как применимые к другим типам рака, включая, но не ограничиваясь ими, рак легких, рак не ЦНС, рак ЦНС и метастазы в ЦНС, такие как метастазы в головном мозге, лептоменингеальные метастазы, хориоидальные метастазы, метастазы в спинном мозге и другие.

Цитоплазматические стабилизаторы p53

Авторы изобретения продемонстрировали, что фармакологическая стабилизация p53, например, с помощью проникающей в ЦНС небольшой молекулы, была синергически летальной с ингибированием EGFR-вызванного поглощения глюкозы в первичных моделях GBM, полученных от пациентов. Авторы изобретения впервые продемонстрировали, что нетранскрипционные функции p53 могут играть решающую роль в стимуляции внутреннего апоптоза у пациентов с метаболической реакцией. Соответственно, описанные в данном документе способы лечения включают введение цитоплазматического стабилизатора(ов) p53 в комбинации с ингибиторами метаболизма глюкозы. Цитоплазматический стабилизатор(ы) p53 и ингибиторы метаболизма глюкозы можно вводить в одной и той же или в разных композициях, одновременно или последовательно. Предполагается, что в некоторых вариантах осуществления используется один стабилизатор p53, а в других вариантах осуществления используется более одного стабилизатора p53. Например, сообщается, что комбинация нутлина с ABT 737 (который связывает BCL-2 и BCL-X_L) синергически воздействует на баланс проапоптотических и антиапоптозных белков на митохондриальном уровне, тем самым способствуя гибели клеток (Hoe *et al*. 2014. Nature Reviews. Vol. 13, pp. 217). Как предполагается в данном документе, цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой любую небольшую молекулу, антитело, пептид, белок, нуклеиновую кислоту или их производные, которые могут непосредственно или опосредованно фармакологически стабилизировать или активировать p53. Стабилизация цитоплазматического p53 приводит к праймированию клеток, таких как раковые клетки, для апоптоза.

Антагонисты MDM2

Уровни белка p53 в клетках строго контролируются и поддерживаются на низком уровне его негативным регулятором, убиквитин-протеинлигазой E3 MDM2. В вариантах осуществления способов или композиции по настоящему изобретению цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой антагонист/ингибитор MDM2. В некоторых вариантах осуществления антагонист MDM2 представляет собой нутлин. В дополнительных вариантах осуществления нутлин представляет собой нутлин-3 или идасанутлин. В других вариантах осуществления антагонист MDM2 представляет собой RO5045337 (также известный как RG7112), RO5503781, RO6839921, SAR405838 (также известный как MI-773), DS-3032, DS-3032b или AMG-232 или любой другой ингибитор MDM2.

Другие соединения в рамках существующих способов, известных для связывания MDM-2, включают Ro-2443, MI-219, MI-713, MI-888, DS-3032b, бензодиазепиндионы (например, TDP521252), сульфонамиды (например, NSC279287), хроменотриазолопиримидин, морфолинон и пиперидиноны (AM-8553), терфенилы, халконы, пиразолы, имидазолы, имидазол-индолы, изоиндолинон, пирролидинон (например, PXN822), приаксон, пиперидины природного происхождения, SAH-8 (скрепленные пептиды) sMTide-02, sMTide-02a (скрепленные пептиды), ATSP-7041 (скрепленный пептид), спиролигомер (имитатор α-спирали). Другие соединения, которые, как известно, вызывают сворачивание белка MDM2, включают PRIMA-1MET (также известный как APR-246), Aprea 102-105, PK083, PK5174, PK5196, PK7088, бензотиазолы, стиктовую кислоту и NSC319726.

Ингибиторы BCL-2

В дополнительных вариантах осуществления текущих способов или композиций цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор BCL-2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор BCL-2 представляет собой, например, антисмысловой олигодезоксинуклеотид G3139, антагонист мРНК SPC2996, венетоклакс (ABT-199), GDC-0199, обатоклакс, паклитаксел, навитоклакс (ABT-263), ABT-737, NU-0129, S 055746, APG-1252 или любой другой ингибитор BCL-2.

Ингибиторы Bcl-xL

В других вариантах осуществления способов или композиций по изобретению цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор Bcl-xL. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Bcl-xL представляет собой, например, WEHI 539, ABT-263, ABT-199, ABT-737, сабутоклакс, AT101, TW-37, APG-1252, гуммигутовую кислоту или любой другой ингибитор Bcl-xL.

Методы оценки

Тесты на поглощение глюкозы

В вариантах осуществления способов и композиций по настоящему изобретению субъект с GBM или раком классифицируется как «пациент с метаболической реакцией» или «пациент без метаболической реакции», то есть определяется как восприимчивый к ингибиторам метаболизма глюкозы. В определенных вариантах осуществления изобретения классификация субъекта проводится до применения в отношении субъекта лечения, включающего ингибитор метаболизма глюкозы и цитоплазматический стабилизатор p53. Соответственно, настоящее описание предоставляет способы оценки рака, классификации субъекта, определения предрасположенности субъекта к лечению, включающему анализ метаболизма глюкозы, гликолиза или поглощения глюкозы. Способы классификации субъекта как пациента с метаболической реакцией подробно описаны в примере 1. Способы мониторинга гликолиза и поглощения глюкозы предоставлены T. TeSlaa and M.A. Teitell. 2014. Methods in Enzymology, Volume 542, pp. 92-114, включенный в данный документ в качестве ссылки.

Гликолиз - это внутриклеточное биохимическое превращение одной молекулы глюкозы в две молекулы пирувата с одновременным образованием двух молекул АТФ. Пируват является промежуточным продуктом метаболизма с несколькими потенциальными метаболическими путями, включая вход в цикл трикарбоновой кислоты (TCA) в митохондриях для выработки NADH и $FADH_2$. Альтернативно пируват может быть преобразован в лактат в цитозоле лактатдегидрогеназой с одновременным восстановлением NAD^+ из NADH. Увеличенный поток за счет гликолиза поддерживает пролиферацию раковых клеток, обеспечивая, например, дополнительную энергию в форме АТФ, а также производных глюкозы промежуточных продуктов метаболизма для биосинтеза нуклеотидов, липидов и белков. Warburg (Oncologia. 1956;9(2):75-83) впервые заметил, что пролиферирующие опухолевые клетки усиливают аэробный гликолиз, превращение глюкозы в лактат в присутствии кислорода, в отличие от незлокачественных клеток, которые в основном дышат при наличии кислорода. Этот митохондриальный обход, называемый эффектом Варбурга, происходит в быстро пролиферирующих клетках, включая раковые клетки, активированные лимфоциты и плюрипотентные стволовые клетки. Эффект Варбурга использовался в клинических диагностических тестах, в которых используется позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) для выявления повышенного клеточного поглощения фторированных аналогов глюкозы, таких как ^{18}F-дезоксиглюкоза.

Таким образом, гликолиз представляют собой мишень для терапевтических и диагностических методов. В контексте существующих способов измерение поглощения глюкозы и выведения лактата злокачественными клетками может быть полезным для обнаружения сдвигов в катаболизме глюкозы и/или восприимчивости к ингибиторам метаболизма глюкозы. Обнаружение таких сдвигов важно для способом лечения GBM, способов снижения риска неэффективной терапии, способов снижения шансов на выживание опухоли. Для целей настоящего изобретения ^{18}F-дезоксиглюкоза ПЭТ в некоторых вариантах осуществления служит быстрым неинвазивным функциональным биомаркером для прогнозирования чувствительности к активации p53. Этот неинвазивный анализ может быть особенно ценным для злокачественных опухолей головного мозга, где оценка фармакокинетики/фармакодинамики чрезвычайно трудна и непрактична. В некоторых случаях протоколы отсроченной визуализации (41) и параметрические карты ответа (PRM) со слиянием ЯМР могут быть полезны для количественной оценки изменений в поглощении опухолями ^{18}F-FDG (42).

В определенных аспектах способы могут относиться к измерению поглощения глюкозы и выведения лактата. Для клеток в культуре гликолитический поток может быть определен количественно путем измерения поглощения глюкозы и выведения лактата. Поглощение глюкозы клеткой происходит через переносчиков глюкозы (Glut1-Glut4), тогда как выведение лактата через переносчиков монокарбоксилата (MCT1-MCT4) на клеточной мембране.

Внеклеточная глюкоза и лактат

Методы определения поглощения глюкозы и выведения лактата включают, например, набор внеклеточной глюкозы или лактата, внеклеточный биоанализатор, измерение ECAR, поглощение [3H]-2-DG или [14C]-2-DG, поглощение ^{18}FDG или поглощение 2-NBDG.

Имеются коммерчески доступные наборы и инструменты для количественного определения уровней глюкозы и лактата в средах для культивирования клеток. Наборы методов обнаружения обычно колориметрические или флуорометрические и совместимы со стандартным лабораторным оборудованием, таким как спектрофотометры. Анализаторы BioProfile (такие как Nova Biomedical) или биохимические анализаторы (такие как, например, YSI Life Sciences) могут измерять уровни как глюкозы, так и лактата в средах для культивирования клеток. GlucCell (Cesco BioProducts) может измерять только уровни глюкозы в средах для культивирования клеток. Хотя каждый коммерческий метод имеет свой протокол обнаружения, набор питательных сред для анализа одинаков.

Скорость внеклеточного закисления

Гликолиз также можно определить путем измерения скорости внеклеточного закисления (ECAR) окружающей среды, которая в основном связана с выведением молочной кислоты в единицу времени после ее преобразования из пирувата. Анализатор внеклеточного потока (XF) Seahorse (Seahorse Bioscience) - это инструмент для измерения гликолиза и окислительного фосфорилирования (через потребление кислорода) одновременно в одних и тех же клетках.

Поглощение аналога глюкозы

Определенные варианты осуществления способов по настоящему изобретению включают использование аналогов глюкозы. Как известно специалисту в данной области техники, для определения скорости поглощения глюкозы клетками меченую изоформу глюкозы можно добавить в среду для культивирования клеток и затем измерить в клетках через заданный период времени. Примеры типов аналогов глюкозы для этих исследований включают, но не ограничиваются ими, радиоактивные аналоги глюкозы, такие как 2-дезокси-D- [1,2-3H] -глюкоза, 2-дезокси-D- [1-14C]-глюкоза, или 2-дезокси-2-(^{18}F) -фтор-D-глюкоза (^{18}FDG), или флуоресцентные аналоги глюкозы, такие как 2-[N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диаксол-4-ил)амино]-2-дезоксиглюкоза (2-NBDG). Для измерения поглощения радиоактивного аналога глюкозы требуется сцинтилляционный счетчик, тогда как поглощение 2-NBDG обычно измеряется с помощью проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления поглощение глюкозы измеряется путем поглощения радиоактивно меченной глюкозой 2-дезокси-2-

[фтор-18] фтор-D-глюкозы (^{18}F-FDG). В дополнительных вариантах осуществления обнаружение ^{18}F-FDG осуществляется с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). В некоторых вариантах осуществления изобретения биопсия берется из опухоли GBM. Подробное описание примера измерения ^{18}F-FDG приведено в примерах ниже.

В определенных аспектах способы могут относиться к сравнению поглощения глюкозы биологическим образцом, таким как образец опухоли, с контролем. Увеличение или уменьшение кратности может быть по меньшей мере или не более 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70-, 75-, 80-, 85-, 90-, 95-, 100- или более или любой диапазон, получаемый из них. В качестве альтернативы, различия в выражении между образцом и эталоном могут быть выражены как процентное уменьшение или увеличение, например как по меньшей мере или максимум 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000% различие или любой диапазон, получаемый из них.

Другими способами выражения относительных уровней экспрессии являются нормализованные или относительные числа, такие как 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, или любой диапазон, получаемый из них. В некоторых вариантах осуществления уровни могут относиться к контролю.

Алгоритмы, такие как программы взвешенного голосования, могут использоваться для облегчения оценки уровней биомаркеров. Кроме того, другие клинические данные могут быть объединены с тестом на основе биомаркеров, чтобы снизить риск ложных оценок. В некоторых вариантах осуществления могут быть рассмотрены другие цитогенетические оценки.

Способы синтеза

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы получения соединений Формулы I, I* или их фармацевтически приемлемой соли согласно схеме 1 или схеме 2.

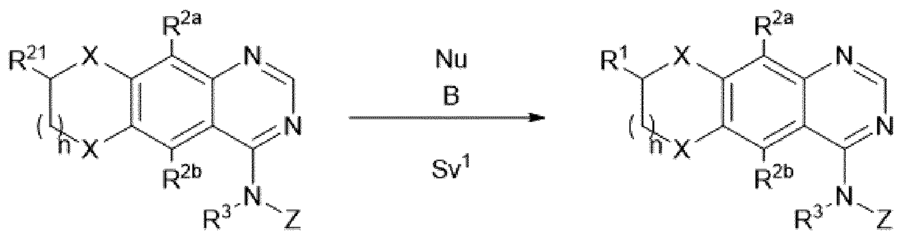


Схема 1

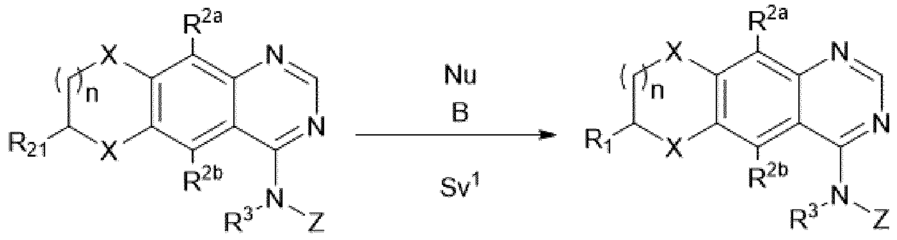


Схема 2

где:

X представляет собой O, S или NH;

Z представляет собой арил или гетероарил;

R^1 представляет собой алкил;

каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из водорода, алкила, галогена, CN и NO_2;

R^3 представляет собой водород, алкил или ацил;

R^4 представляет собой алкокси;

R^5 представляет собой алкил;

R^{21} представляет собой алкил, замещенный уходящей группой, например, галогеналкил или сульфонилалкил;

B представляет собой основание;

Nu представляет собой азот-содержащий гетероцикл (например, имеющий по меньшей одну связь N-H), аминоалкил или гидроксиалкил;

Sv^1 представляет собой растворитель; и

n равно 0-3.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления R^{21} представляет собой сульфонилалкил (например, $CH_3S(O)_2OCH_2$-).

В определенных вариантах осуществления B представляет собой азотистое основание (например, триэтиламин или диизопропилэтиламин).

В определенных вариантах осуществления Nu представляет собой азот-содержащий гетероцикл, имеющий по меньшей мере одну связь N-H (например, морфолин, N-метилпиперазин, пиперидин или пирролидин). В других вариантах осуществления Nu представляет собой аминоалкил (например, диметиламин).

В определенных вариантах осуществления растворитель является апротонным растворителем (например, диметилформамид).

В определенных предпочтительных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию по схеме 3 или 4:

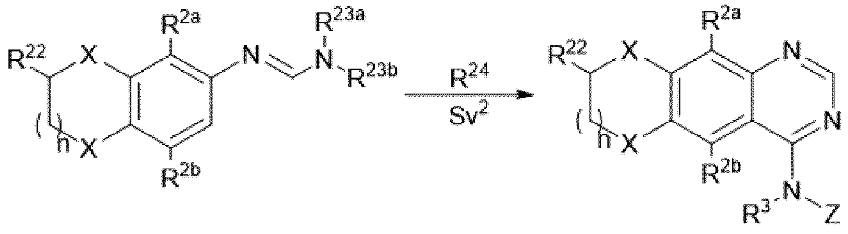


Схема 3

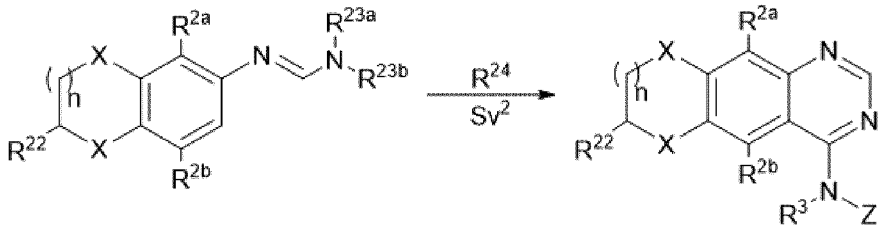


Схема 4

где:

R^{22} представляет собой алкил или гидроксиалкил;

каждый из R^{23a} и R^{23b} представляет собой алкил;

R^{24} представляет собой аминоарил или аминогетероарил; и

Sv^2 представляет собой кислоту.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления R^{22} представляет собой гидроксиалкил.

В определенных вариантах осуществления каждый из R^{23a} и R^{23b} представляет собой метил.

В определенных вариантах осуществления R^{24} представляет собой аминоарил. В других вариантах осуществления R^{24} представляет собой аминогетероарил.

В определенных вариантах осуществления Sv^2 представляет собой алкилкислоту (например, уксусную кислоту).

В определенных предпочтительных вариантах осуществления стадию со схемы 3 или 4 проводят при температуре в диапазоне 115-150°C. В определенных вариантах осуществления стадию осуществляют при температуре в диапазоне 125-130°C. В определенных вариантах осуществления стадия дополнительно включает обработку основанием, например, гидроксидом аммония.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию очистки. В определенных вариантах осуществления стадия очистки включает колоночную хроматографию, препаративную тонкослойную хроматографию или высокоэффективную жидкостную хроматографию.

Определения

Если в настоящем документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в настоящей заявке, должны иметь значения, которые обычно понимаются средними специалистами в данной области техники. Как правило, номенклатура, используемая в связи с химическими методами, методиками культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, клеточной и онкологической биологии, нейробиологии, нейрохимии, вирусологии, иммунологии, микробиологии, фармакологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области.

Способы и методики настоящего описания, как правило, выполняются, если не указано иное, в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании. См., например, “Principles of Neural Science”, McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, “Intuitive Biostatistics”, Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et al., “Molecular Cell Biology, 4th ed.”, W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths et al., “Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.”, W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999); и Gilbert et al., “Developmental Biology, 6th ed.”, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000).

Химические термины, используемые в настоящем документе, если здесь не указано иное, используются в соответствии с общепринятым применением в данной области техники, как показано в “The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms”, Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985).

Все вышеперечисленное и любые другие публикации, патенты и опубликованные патентные заявки, упомянутые в данной заявке, специально включены в настоящий документ посредством ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая его конкретные определения, будет иметь преимущественную силу.

Термин «агент» используется в настоящем документе для обозначения химического соединения (такого как органическое или неорганическое соединение, смесь химических соединений), биологической макромолекулы (такой как нуклеиновая кислота, антитело, включая их части, а также гуманизированные, химерные и человеческие антитела и моноклональные антитела, белок или его часть, например, пептид, липид, углевод), или экстракт, полученный из биологических материалов, таких как клетки бактерий и клетки или ткани растений, грибов или животных (особенно млекопитающих). Агенты включают, например, агенты, структура которых известна, и агенты, структура которых неизвестна. Способность таких агентов ингибировать AR или способствовать деградации AR может сделать их пригодными в качестве «терапевтических агентов» в способах и композициях по настоящему изобретению.

«Пациент», «субъект» или «индивидуум» используются взаимозаменяемо и относятся к человеку или животному, не являющемуся человеком. Эти термины включают млекопитающих, таких как люди, приматы, сельскохозяйственные животные (включая коров, свиней и т. д.), домашние животные (например, собаки, кошки и т. д.) и грызуны (например, мыши и крысы).

«Лечение» состояния или пациента означает принятие мер для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. В контексте настоящего документа и как хорошо известно в данной области, «лечение» представляет собой подход для получения благоприятных или желательных результатов, включая клинические результаты. Полезные или желательные клинические результаты могут включать, но не ограничиваются ими, ослабление или улучшение одного или нескольких симптомов или состояний, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (то есть не ухудшение) состояния заболевания, предотвращение распространения заболевания, задержку или замедление развития заболевания, улучшение или временное смягчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемые или не обнаруживаемые.

«Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится.

Термин «предотвращение» является общепризнанным в данной области техники, и при использовании в отношении состояния, такого как местный рецидив (например, боль), заболевания, такого как рак, синдромного комплекса, такого как сердечная недостаточность, или любого другого медицинского состояния, хорошо понимается в данной области техники и включает введение композиции, которая уменьшает частоту или замедляет появление симптомов медицинского состояния у субъекта по сравнению с субъектом, который не получает композицию. Таким образом, профилактика рака включает, например, уменьшение количества обнаруживаемых раковых образований в популяции пациентов, получающих профилактическое лечение по сравнению с нелеченной контрольной популяцией, и/или задержку появления выявляемых раковых образований в леченной популяции по сравнению с нелеченными контрольными популяциями, например, статистически и/или клинически значимым количеством.

«Применение» или «введение» вещества, соединения или агента субъекту может быть осуществлено с использованием одного из множества способов, известных специалистам в данной области техники. Например, соединение или агент можно вводить внутривенно, артериально, внутрикожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, через глаза, сублингвально, перорально (путем приема внутрь), интраназально (путем ингаляции), внутриспинально, интрацеребрально и трансдермально (путем абсорбции, например, через кожный проток). Соединение или агент также можно соответствующим образом вводить с помощью перезаряжаемых или биоразлагаемых полимерных устройств или других устройств, например пластырей и насосов, или составов, которые обеспечивают пролонгированное, медленное или контролируемое высвобождение соединения или агента. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

Подходящие способы введения вещества, соединения или агента субъекту также будут зависеть, например, от возраста и/или физического состояния субъекта и химических и биологических свойств соединения или агента (например, растворимости, усвояемости, биодоступности, стабильности и токсичности). В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение или агент вводят перорально, например, субъекту путем приема внутрь. В некоторых вариантах осуществления перорально вводимое соединение или агент находится в составе с пролонгированным или замедленным высвобождением или вводится с использованием устройства для такого медленного или пролонгированного высвобождения.

Используемое в данном документе выражение «совместное введение» относится к любой форме введения двух или нескольких различных терапевтических агентов, так что второй агент вводят, в то время как ранее введенный терапевтический агент все еще эффективен в организме (например, два агента являются одновременно эффективными у пациента, что может включать синергетическое действие двух агентов). Например, различные терапевтические соединения могут вводиться либо в одной и той же композиции, либо в отдельных композициях, одновременно или последовательно. Таким образом, индивидуум, который получает такое лечение, может получить пользу от комбинированного действия различных терапевтических агентов.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или агента представляет собой количество лекарственного средства или агента, которое при введении субъекту будет иметь предполагаемый терапевтический эффект. Полный терапевтический эффект необязательно возникает при введении одной дозы и может происходить только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений. Точное эффективное количество, необходимое для субъекта, будет зависеть, например, от размера, состояния здоровья и возраста субъекта, а также от характера и степени тяжести состояния, подвергаемого лечению, такого как рак или MDS. Специалист может легко определять эффективное количество для данной ситуации путем рутинных экспериментов.

В контексте данного документа «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное после этого событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда происходит указанное событие или обстоятельство, и случаи, когда этого не происходит. Например, «необязательно замещенный алкил» относится к алкилу, который может быть замещенным, а также к тому, где алкил не замещен.

Следует понимать, что заместители и схемы замещения в соединениях по настоящему изобретению могут быть выбраны одним из обычных специалистов в данной области для получения химически стабильных соединений, которые можно легко синтезировать методами, известными в данной области техники, а также указанными способами ниже, из легкодоступных исходных материалов. Если заместитель сам замещен более чем одной группой, понятно, что эти множественные группы могут находиться на одном и том же атоме углерода или на разных атомах углерода, при условии, что в результате получается стабильная структура.

Используемый в данном документе термин «необязательно замещенный» относится к замене от одного до шести водородных радикалов в данной структуре радикалом указанного заместителя, включая, но не ограничиваясь ими: гидроксил, гидроксиалкил, алкокси, галоген, алкил, нитро, силил, ацил, ацилокси, арил, циклоалкил, гетероциклил, амино, аминоалкил, циано, галогеналкил, галогеналкокси, -OCO-CH_2-O-алкил, -OP(O)(O-алкил)$_2$ или -CH_2-OP(O)(O-алкил)$_2$. Предпочтительно «необязательно замещенный» относится к замене от одного до четырех водородных радикалов в данной структуре заместителями, упомянутыми выше. Более предпочтительно от одного до трех водородных радикалов заменены заместителями, как указано выше. Следует понимать, что заместитель может быть дополнительно замещен.

Используемый в данном документе термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим группам, включая, но не ограничиваясь ими, C_1-C_{10} алкильные группы с прямой цепью или C_1-C_{10} алкильные группы с разветвленной цепью. Предпочтительно «алкильная» группа относится к C_1-C_6 алкильным группам с прямой цепью или C_1-C_6 алкильным группам с разветвленной цепью. Более предпочтительно «алкильная» группа относится к C_1-C_4 алкильным группам с прямой цепью или C_1-C_4 алкильным группам с разветвленной цепью. Примеры “алкила” включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, 1-пентил, 2-пентил, 3-пентил, нео-пентил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 1-гептил, 2-гептил, 3-гептил, 4-гептил, 1-октил, 2-октил, 3-октил или 4-октил и т. п. “Алкильная” группа может быть необязательно замещена.

Термин «ацил» является принятым в данной области техники и относится к группе, представленной общей формулой гидрокарбилC(O)-, предпочтительно алкилC(O)-.

Термин «ациламино» является принятым в данной области техники и относится к аминогруппе, замещенной ацильной группой, и может быть представлен, например, формулой гидрокарбилC(O)NH-.

Термин «ацилокси» является принятым в данной области техники и относится к группе, представленной общей формулой гидрокарбилC(O)O-, предпочтительно алкилC(O)O-.

Термин «алкокси» относится к алкильной группе, имеющей присоединенный к ней атом кислорода. Характерные алкокси-группы включают метокси, этокси, пропокси, трет-бутокси и т. п.

Термин «алкоксиалкил» относится к алкильной группе, замещенной алкокси-группой, и может быть представлен общей формулой алкил-O-алкил.

Термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим группам, включая алкильные группы с неразветвленной цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, алкилзамещенные циклоалкильные группы и циклоалкилзамещенные алкильные группы. В предпочтительных вариантах осуществления алкил с неразветвленной или разветвленной цепью имеет 30 или менее атомов углерода в своей основной цепи (например, C_{1-30} для неразветвленных цепей, C_{3-30} для разветвленных цепей) и более предпочтительно 20 или менее.

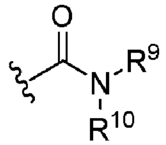
Кроме того, термин «алкил», используемый в описании, примерах и формуле изобретения, предназначен для включения как незамещенных, так и замещенных алкильных групп, последняя из которых относится к алкильным фрагментам, имеющим заместители, замещающие атом водорода на одном или нескольких атомах углерода углеводородной цепи, включая галогеналкильные группы, такие как трифторметил и 2,2,2-трифторэтил и т. д.

Термин «C_{x-y}» или «C_x-C_y», когда он используется в сочетании с химическим фрагментом, таким как ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси, подразумевает включение групп, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. C_0алкил обозначает водород, где группа находится в концевом положении, связь, если она внутренняя. Например, C_{1-6}алкильная группа содержит от одного до шести атомов углерода в цепи.

В контексте настоящего документа термин «алкиламино» относится к амино группе, замещенной по меньшей мере одной алкильной группой.

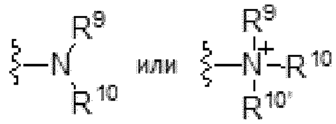
В контексте настоящего документа термин «алкилтио» относится к тиольной группе, замещенной алкильной группой, и может быть представлен общей формулой алкилS-.

В контексте настоящего документа термин «амид» относится к группе,


,

где каждый из R^9 и R^{10} независимо представляет собой водород или гидрокарбильную группу, или R^9 и R^{10}, взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, составляют гетероцикл, имеющий от 4 до 8 атомов в кольцевой структуре.

Термины «амин» и «амино» являются известными в данной области техники и относятся как к незамещенным, так и замещенным аминам и их солям, например, к группе, которая может быть представлена


,

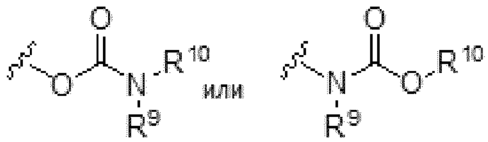
где каждый из R^9, R^{10} и $R^{10'}$ независимо представляет собой водород или гидрокарбильную группу, или R^9 и R^{10}, взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, составляют гетероцикл, имеющий от 4 до 8 атомов в кольцевой структуре.

В контексте настоящего документа термин «аминоалкил» относится к алкильной группе, замещенной амино-группой.

В контексте настоящего документа термин «аралкил» относится к алкильной группе, замещенной арильной группой.

В контексте настоящего документа термин «арил» включает замещенные или незамещенные ароматические группы с одним кольцом, в которых каждый атом в кольце представляет собой атом углерода. Предпочтительно кольцо представляет собой 5-7-членное кольцо, более предпочтительно 6-членное кольцо. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, где по меньшей мере одно из колец является ароматическим, например, другие циклические кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами, гетероарилами и/или гетероциклилами. Арильные группы включают бензол, нафталин, фенантрен, фенол, анилин и т. п.

Термин «карбамат» является принятым в данной области техники и относится к группе



,

где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбильную группу.

В контексте настоящего документа термин «карбоциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной карбоциклической группой.

Термин «карбоцикл» включает 5-7 членные моноциклические и 8-12 членные бициклические кольца.Каждое кольцо бициклического карбоцикла может быть выбрано из насыщенных, ненасыщенных и ароматических колец. Карбоцикл включает бициклические молекулы, в которых один, два или три или более атомов являются общими для двух колец. Термин «конденсированный карбоцикл» относится к бициклическому карбоциклу, в котором каждое из колец разделяет два соседних атома с другим кольцом. Каждое кольцо конденсированного карбоцикла может быть выбрано из насыщенных, ненасыщенных и ароматических колец. В иллюстративном варианта осуществления ароматическое кольцо, например, фенил, может быть конденсировано с насыщенным или ненасыщенным кольцом, например, циклогексаном, циклопентаном или циклогексеном. Любая комбинация насыщенных, ненасыщенных и ароматических бициклических колец, насколько позволяет валентность, включена в определение карбоциклический. Примеры «карбоциклов» включают циклопентан, циклогексан, бицикло[2.2.1]гептан, 1,5-циклооктадиен, 1,2,3,4-тетрагидронафталин, бицикло[4.2.0]окт-3-ен, нафталин и адамантан. Примеры конденсированных карбоциклов включают декалин, нафталин, 1,2,3,4-тетрагидронафталин, бицикло[4.2.0]октан, 4,5,6,7-тетрагидро-1H-инден и бицикло[4.1.0]гепт-3-ен. «Карбоциклы» могут быть замещены по любому или более положениям, способным нести атом водорода.

В контексте настоящего документа термин «карбоциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной карбоциклической группой.

Термин «карбонат» является признанным в данной области техники и относится к группе $-OCO_2-$.

В контексте настоящего документа термин «карбокси» относится к группе, представленной формулой $-CO_2H$.

В контексте настоящего документа термин «сложный эфир» относится к группе $-C(O)OR^9$, где R^9 представляет собой гидрокарбильную группу.

В контексте настоящего документа термин «простой эфир» относится к гидрокарбильной группе, соединенной через атом кислорода с другой гидрокарбильной группой. Соответственно, простой эфирный заместитель гидрокарбильной группы может представлять собой гидрокарбил-O-. Простые эфиры могут быть как симметричными, так и несимметричными. Примеры простых эфиров включают, помимо прочего, гетероцикл-O-гетероцикл и арил-O-гетероцикл. Простые эфиры включают «алкоксиалкильные» группы, которые могут быть представлены общей формулой алкил-O-алкил.

В контексте настоящего документа термины «гало» и «галоген» означают галоген и включает хлор, фтор, бром и йод.

В контексте настоящего документа термины «гетаралкил» и «гетероаралкил» относятся к алкильной группе, замещенной гетарильной группой.

Термины «гетероарил» и «гетарил» включают замещенные или незамещенные ароматические однокольцевые структуры, предпочтительно, 5-7-членные кольца, более предпочтительно, 5-6-членные кольца, где кольцевые структуры включают по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно, от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно, один или два гетероатома. Термины «гетероарил» и «гетарил» включают также полициклические кольцевые системы, содержащие два или более циклических колец, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, где по меньшей мере одно из колец является гетероароматическим, например, другие циклические кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Гетероарильные группы включают, например, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин и тому подобное.

В контексте настоящего документа термин «гетероатом» означает атом любого элемента, отличного от углерода или водорода. Предпочтительными гетероатомами являются азот, кислород и сера.

В контексте настоящего документа термин «гетероциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероциклической группой.

Термины «гетероциклил», «гетероцикл» и «гетероциклический» относятся к замещенным или незамещенным неароматическим кольцевым структурам, предпочтительно, 3-10-членным кольцам, более предпочтительно, 3-7-членным кольцам, где кольцевые структуры включают по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно, от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно, один или два гетероатома. Термины «гетероциклил» и «гетероциклический» включают также полициклические кольцевые системы, содержащие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, где по меньшей мере одно из колец является гетероциклическим, например, другие циклические кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Гетероциклильные группы включают, например, пиперидин, пиперазин, пирролидин, морфолин, лактоны, лактамы и тому подобное.

В контексте настоящего документа термин «гидрокарбил» относится к группе, которая связана через атом углерода, у которого не имеется заместителя =O или =S, и обычно содержит по меньшей мере одну углерод-водородную связь и преимущественно углеродный скелет, но необязательно может включать гетероатомы. Таким образом, группы, такие как метил, этоксиэтил, 2-пиридил и даже трифторметил, считаются гидрокарбильными для целей настоящей заявки, а такие заместители, как ацетил (который имеет заместитель =O на связующем атоме углерода) и этокси (который связан через атом кислорода, а не углерода) нет. Гидрокарбильные группы включают, но не ограничиваются ими, арил, гетероарил, карбоцикл, гетероцикл, алкил, алкенил, алкинил и их комбинации.

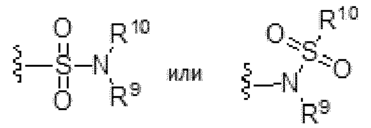
В контексте настоящего документа термин «гидроксиалкил» относится к алкильной группе, замещенной гидрокси-группой.

Термин «низший» при использовании в сочетании с химическим фрагментом, таким как ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси, подразумевает включение групп, где в заместителе имеется десять или меньше атомов, предпочтительно шесть или меньше. «Низший алкил», например, относится к алкильной группе, которая содержит десять или менее атомов углерода, предпочтительно, шесть или менее. В определенных вариантах осуществления ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил, или алкокси заместители, определенные в настоящем документе, представляют собой, соответственно, низший ацил, низший ацилокси, низший алкил, низший алкенил, низший алкинил или низший алкокси, представлены ли они сами по себе или в комбинации с другими заместителями, такими как в описаниях гидроксиалкил и аралкил (в этом случае, например, атомы в арильной группе не учитываются при подсчете атомов углерода в алкильном заместителе).

Термины «полициклил», «полицикл» и «полициклический» относятся к двум или более кольцам (например, циклоалкилам, циклоалкенилам, циклоалкинилам, арилам, гетероарилам и/или гетероциклилам), в которых два или более атомов являются общими для двух соседних колец, например, кольца представляют собой «коденсированные кольца». Каждое из колец полицикла может быть замещенным или незамещенным. В определенных вариантах осуществления каждое кольцо полицикла содержит от 3 до 10 атомов в кольце, предпочтительно от 5 до 7.

Термин «сульфат» известен в данной области техники и относится к группе $-OSO_3H$ или ее фармацевтически приемлемой соли.

Термин «сульфонамид» известен в данной области техники и относится к группе, представленной общими формулами



,

где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбил.

Термин «сульфоксид» является общепризнанным в данной области техники и относится к группе -S(O)-.

Термин «сульфонат» является принятым в данной области техники и относится к группе $-SO_3H$ или ее фармацевтически приемлемой соли.

Термин «сульфон» известен в данной области техники и относится к группе $-S(O)_2-$

.

Термин «замещенный» относится к фрагментам, имеющим заместители, заменяющие водород на одном или более атомах углерода основной цепи. Следует понимать, что «замещение» или «замещенный» включает в себя неявное условие, что такое замещение соответствует допустимой валентности замещенного атома и заместителя, и что замещение приводит к стабильному соединению, например, которое самопроизвольно не подвергается трансформации, такой как перегруппировка, циклизация, элиминирование и т. д. В контексте настоящего документа термин «замещенный» предполагает включение всех допустимых заместителей органических соединений. В широком аспекте допустимые заместители включают ациклические и циклические, разветвленные и неразветвленные, карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические заместители органических соединений. Допустимые заместители могут быть одним или более и одинаковыми или разными для соответствующих органических соединений. Для целей настоящего изобретения гетероатомы, такие как азот, могут иметь водородные заместители и/или любые допустимые заместители органических соединений, описанных в данном документе, которые удовлетворяют валентности гетероатомов. Заместители могут включать любые заместители, описанные в настоящем документе, например, галоген, гидроксил, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как тиоэфир, тиоацетат или тиоформиат), алкоксил, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, амино, амидо, амидин, имин, циано, нитро, азидо, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфамоил, сульфонамидо, сульфонил, гетероциклил, аралкил или ароматический или гетероароматический фрагмент. Специалистам в данной области техники будет понятно, что фрагменты, замещенные в углеводородной цепи, сами могут быть замещенными, если это необходимо.

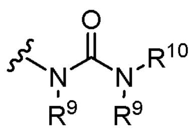
В контексте настоящего документа термин «тиоалкил» относится к алкильной группе, замещенной тиольной группой.

В контексте настоящего документа термин «сложный тиоэфир» относится к группе $-C(O)SR^9$ или $-SC(O)R^9$,

где R^9 представляет собой гидрокарбил.

В контексте настоящего документа термин «простой тиоэфир» эквивалентен простому эфиру, где атом кислорода заменен на атом серы.

Термин «мочевина» является принятым в данной области техники и может быть представлен общей формулой


,

где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбил.

Используемый в настоящем документе термин «модулировать» включает ингибирование или подавление функции или активности (такой как пролиферация клеток), а также усиление функции или активности.

Фраза «фармацевтически приемлемый» признана в данной области техники. В определенных вариантах осуществления термин включает композиции, вспомогательные вещества, адъюванты, полимеры и другие материалы и/или лекарственные формы, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением пользы/риска.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» или «соль» используется в настоящем документе для обозначения соли присоединения кислоты или соли присоединения основания, которая подходит для лечения пациентов или совместима с ним.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты» означает любую нетоксичную органическую или неорганическую соль любых основных соединений, представленных Формулой I. Иллюстративные неорганические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают в себя соляную, бромистоводородную, серную и фосфорную кислоты, а также соли металлов, такие как моногидроортофосфат натрия и гидросульфат калия. Иллюстративные органические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают в себя моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, такие как гликолевая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, глутаровая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, бензойная, фенилуксусная, коричная и салициловая кислоты, а также сульфоновые кислоты, такие как п-толуолсульфоновая и метансульфоновая кислоты. Могут быть образованы моно- или дикислотные соли, и такие соли могут существовать в гидратированной, сольватированной или практически безводной форме. Как правило, соли присоединения кислоты соединений Формулы I более растворимы в воде и различных гидрофильных органических растворителях и обычно демонстрируют более высокие температуры плавления по сравнению с их формами свободного основания. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области техники. Другие фармацевтически неприемлемые соли, например, оксалаты, могут быть использованы, например, для выделения соединений Формулы I для лабораторного применения или для последующего превращения в фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты.

Термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения основания», как он используется в настоящем документе, означает любую нетоксичную соль присоединения органического или неорганического основания любых кислотных соединений, представленных Формулой I, или любых их промежуточных соединений. Иллюстративные неорганические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя гидроксид лития, натрия, калия, кальция, магния или бария. Иллюстративные органические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя алифатические, алициклические или ароматические органические амины, такие как метиламин, триметиламин и пиколин или аммиак. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области техники.

Многие из соединений, полезных в способах и композициях данного описания, имеют по меньшей мере один стереогенный центр в своей структуре. Этот стереогенный центр может присутствовать в конфигурации R или S, указанные обозначения R и S используются в соответствии с правилами, описанными в Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-

30. В описании рассматриваются все стереоизомерные формы, такие как энантиомерные и диастереоизомерные формы соединений, солей, пролекарств или их смесей (включая все возможные смеси стереоизомеров). См., например, WO 01/062726.

Кроме того, некоторые соединения, которые содержат алкенильные группы, могут существовать в виде Z (zusammen, вместе) или E (entgegen, напротив) изомеров. В каждом случае описание включает как смесь, так и отдельные индивидуальные изомеры.

Некоторые из соединений могут также существовать в таутомерных формах. Такие формы, хотя они явно не указаны в формулах, описанных в настоящем документе, предназначены для включения в объем настоящего описания.

«Пролекарство» или «фармацевтически приемлемое пролекарство» относится к соединению, которое метаболизируется, например, гидролизуется или окисляется, в хозяине после введения с образованием соединения по настоящему изобретению (например, соединений формулы I). Типичные примеры пролекарств включают соединения, которые имеют биологически лабильные или расщепляемые (защитные) группы на функциональном фрагменте активного соединения. Пролекарства включают соединения, которые можно окислять, восстанавливать, аминировать, дезаминировать, гидроксилировать, дегидроксилировать, гидролизовать, дегидролизовать, алкилировать, дезалкилировать, ацилировать, дезацилировать, фосфорилировать или дефосфорилировать для получения активного соединения. Примеры пролекарств, использующих сложный эфир или фосфорамидат в качестве биологически лабильных или расщепляемых (защитных) групп, раскрыты в патентах США 6,875,751, 7,585,851 и 7,964,580, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Пролекарства по настоящему изобретению метаболизируются с образованием соединения Формулы I. Настоящее изобретение включает в свой объем пролекарства соединений, описанных в настоящем документе. Обычные процедуры выбора и приготовления подходящих пролекарств описаны, например, в “Design of Prodrugs” Ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель» при использовании в настоящем документе означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый фильтр, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, пригодный для приготовления лекарственного средства для медицинского или терапевтического применения.

Используемые здесь термины «Log растворимости», «LogS» или «logS» используются в данной области для количественного определения растворимости соединения в воде. Растворимость соединения в воде значительно влияет на его характеристики всасывания и распределения. Низкая растворимость часто сопровождается плохой абсорбцией. Значение LogS представляет собой логарифм с отделенной единицей (основание 10) растворимости, измеренной в моль/литр.

Фармацевтические композиции

Композиции и способы по настоящему изобретению могут применяться для лечения индивидуума, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее, такое как человек, или млекопитающее, не являющееся человеком. При введении животному, такому как человек, композицию или соединение предпочтительно вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, соединения по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области и включают, например, водные растворы, такие как вода или физиологически забуференный солевой раствор, или другие растворители или носители, такие как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло, или инъекционные органические сложные эфиры. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, когда такие фармацевтические композиции предназначены для введения человеку, особенно для инвазивных путей введения (то есть путей, таких как инъекция или имплантация, которые обеспечивают преодолевающий перенос или диффузию через эпителиальный барьер), водный раствор не содержит пирогенов или практически не содержит пирогенов. Вспомогательные вещества могут быть выбраны, например, для осуществления отсроченного высвобождения агента или для избирательного нацеливания на одну или более клеток, тканей или органов. Фармацевтическая композиция может быть в форме единичной дозы, такой как таблетка, капсула (включая вскрываемую капсулу и желатиновую капсулу), гранула, лиофильный препарат для разведения, порошок, раствор, сироп, суппозиторий, инъекция или тому подобное. Композиция также может присутствовать в системе трансдермальной доставки, например кожном пластыре. Композиция также может присутствовать в растворе, подходящем для местного применения, таком как лосьон, крем или мазь.

Фармацевтически приемлемый носитель может содержать физиологически приемлемые агенты, которые действуют, например, для стабилизации, увеличения растворимости или увеличения абсорбции соединения, такого как соединение по изобретению. Такие физиологически приемлемые агенты включают, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы или вспомогательные вещества. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, включая физиологически приемлемый агент, зависит, например, от пути введения композиции. Препарат или фармацевтическая композиция могут быть самоэмульгирующей системой доставки лекарств или системой лекарственной доставки с самопроизвольным формированием микроэмульсии. Фармацевтическая композиция (препарат) также может представлять собой липосому или другую полимерную матрицу, которая может включать, например, соединение по изобретению. Например, липосомы, которые содержат фосфолипиды или другие липиды, являются нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просты в изготовлении и применении.

Фраза «фармацевтически приемлемый» применяется в настоящем документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках рационального медицинского решения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению пользы/риска.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего документа означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами состава и не причиняет вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиториев; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновая кислота; (16) апирогенная вода; (17) изотонический физиологический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Фармацевтическую композицию (препарат) можно вводить субъекту любым из ряда способов введения, включая, например, пероральное введение (например, капли, как в водных или неводных растворах или суспензиях, таблетки, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык); всасывание через слизистую оболочку полости рта (например, сублингвально); подкожно; трансдермально (например, в виде пластыря, нанесенного на кожу); и местно (например, в виде крема, мази или спрея, нанесенных на кожу). Соединение также может быть составлено для ингаляции. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение может быть просто растворено или суспендировано в стерильной воде. Подробности подходящих путей введения и подходящих для них композиций можно найти, например, в патентах США №№ 6,110,973, 5,763,493, 5,731,000, 5,541,231, 5,427,798, 5,358,970 и 4,172,896, а также в цитированных в них патентах.

Составы можно удобно предоставлять в стандартной дозированной форме и можно получать любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от организма, который лечат, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной дозированной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтический эффект. В целом, из ста процентов это количество будет варьировать от около 1 процента до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от около 5 процентов до около 70 процентов, наиболее предпочтительно от около 10 процентов до около 30 процентов.

Способы приготовления этих составов или композиций включают стадию объединения активного соединения, такого как соединение изобретения, с носителем и, необязательно, одним или более дополнительными ингредиентами. Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения соединения настоящего изобретения с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями, или ими обоими, а затем, при необходимости, формованием продукта.

Составы по изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть в форме капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), крахмальных капсул, пилюль, таблеток, леденцов (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и гуммиарабика или трагаканта), лиофильных препаратов, порошков, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик) и/или в виде средств для полоскания рта и тому подобного, каждая из которых содержит заранее определенное количество соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента. Композиции или соединения также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

Для приготовления твердых дозированных форм для перорального введения (капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и тому подобное) активный ингредиент смешивают с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или фосфат дикальция, и/или любым из следующего: (1) наполнители или добавки, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие вещества, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющие растворение агенты, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; (10) комплексообразующие агенты, такие как модифицированные и немодифицированные циклодекстрины; и (11) красители. В случае капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблеток и пилюль фармацевтические композиции также могут содержать буферные агенты. Твердые композиции подобного типа также могут применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с применением таких эксципиентов как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное

Таблетку можно получать путем прессования или формовки, необязательно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть приготовлены с использованием связующего (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, дезинтегранта (например, натрий гликолята крахмала или сшитой натрий карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки могут быть изготовлены путем формования в подходящем аппарате смеси порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций, такие как драже, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), пилюли и гранулы, могут быть необязательно с насечкой или приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтики. Они также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение в нем активного ингредиента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях, чтобы обеспечить желаемый профиль высвобождения, другие полимерные матрицы, липосомы и/или микросферы. Они могут быть стерилизованы, например, фильтрованием через задерживающий бактерии фильтр или включением стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворить в стерильной воде или в некоторой другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед использованием. Эти композиции также могут, необязательно, содержать замутнители и могут представлять собой композицию, из которой они высвобождают только активный(ые) ингредиент(ы) или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с задержкой. Примеры композиций встраивания, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может находиться в микроинкапсулированной форме, если это уместно, с одним или более вышеописанными вспомогательными веществами.

Жидкие лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают фармацевтически приемлемые эмульсии, лиофильные препараты для разведения, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, циклодекстрины и их производные, солюбилизирующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот с сорбитаном и их смеси.

Помимо инертных разбавителей, композиции для ухода за полостью рта могут также включать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения включают порошки, аэрозоли, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать в дополнение к активному соединению эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и аэрозоли могут содержать, в дополнение к активному соединению, эксципиенты, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошок полиамидов, или смеси этих веществ. Аэрозоли могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки соединения настоящего изобретения в организм. Такие лекарственные формы могут быть изготовлены путем растворения или диспергирования активного соединения в подходящей среде. Усилители абсорбции также могут быть использованы для увеличения потока соединения через кожу. Скорость такого потока может контролироваться либо предоставлением регулирующей скорость мембраны, либо диспергированием соединения в полимерной матрице или геле.

Фразы «парентеральное введение» и «введенный парентерально», используемые в данном документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, содержат одно или более активных соединений в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть разведены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты, растворимые вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующими или загущающими агентами.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут использоваться в фармацевтических композициях изобретения, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и тому подобного. Также может быть желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть вызвано включением агентов, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях для пролонгирования действия лекарственного средства, желательно замедлять абсорбцию лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществлять посредством применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего плохую растворимость в воде. Скорость абсорбции лекарственного средства зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. Альтернативно, замедленное всасывание парентерально вводимой лекарственной формы осуществляют путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Инъекционные депо-формы получают путем формирования микрокапсулированных матриц рассматриваемых соединений в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера и природы конкретного используемого полимера скорость высвобождения лекарства можно контролировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Депо-инъекционные составы также готовят путем заключения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Для использования в способах по изобретению активные соединения могут быть даны сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99,5% (более предпочтительно от 0,5 до 90%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Способы введения могут также обеспечиваться перезаряжаемыми или биоразлагаемыми устройствами. В последние годы были разработаны и испытаны *in vivo* различные полимерные устройства с медленным высвобождением для контролируемой доставки лекарств, включая белковые биофармацевтические препараты. Различные биосовместимые полимеры (включая гидрогели), включая как биоразлагаемые, так и неразлагаемые полимеры, могут быть использованы для формирования имплантата для замедленного высвобождения соединения в конкретном целевом месте.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсического эффекта для пациента.

Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения или комбинации соединений или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого(ых) соединения(й), продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с применяемыми конкретным(ыми) соединением(ями), возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, которого лечат, и подобные факторы, хорошо известные в данной области медицины.

Врач или ветеринар, имеющий обычные навыки в данной области, может легко определять и назначать терапевтически эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать прием доз фармацевтической композиции или соединения с уровней ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Под «терапевтически эффективным количеством» подразумевается концентрация соединения, которая является достаточной для достижения необходимого терапевтического эффекта. Обычно считается, что эффективное количество соединения будет варьироваться в зависимости от веса, пола, возраста и истории болезни субъекта. Другие факторы, которые влияют на эффективное количество, могут включать, помимо прочего, тяжесть состояния пациента, расстройство, которое лечат, стабильность соединения и, если желательно, другой тип терапевтического средства, вводимого с соединением по настоящему изобретению. Большая общая доза может быть доставлена путем многократного введения агента. Способы определения эффективности и дозировки известны специалистам в данной области техники (Isselbacher et al. (1996) Harrison's Principles of Internal Medicine 13 ed., 1814-1882, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

В общем, подходящая суточная доза активного соединения, используемого в композициях и способах изобретения, будет представлять собой такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от описанных выше факторов.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых раздельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно, в единичных дозированных формах. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения активное соединение может вводиться два или три раза в день. В предпочтительных вариантах осуществления активное соединение будет вводиться один раз в день.

Пациентом, получающим такое лечение, является любое нуждающееся животное, включая приматов, в частности людей; и другие млекопитающие, такие как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, кошки и собаки; птицы; и домашние животные в целом.

В определенных вариантах осуществления соединения изобретения могут вводиться отдельно или совместно с терапевтическим агентом другого типа.

Настоящее описание включает использование фармацевтически приемлемых солей соединений по изобретению в композициях и способах по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления предполагаемые соли по настоящему изобретению включают, помимо прочего, соли алкила, диалкила, триалкила или тетраалкиламмония. В определенных вариантах осуществления предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, L-аргинин, бенентамин, бензатин, бетаин, гидроксид кальция, холин, динол, диэтаноламин, диэтиламин, 2-(диэтиламино)этанол, этаноламин, этилендиамин, N-метилглюкамин, гидрабамин, 1H-имидазол, литий, L-лизин, магний, 4-(2-гидроксиэтил)морфолин, пиперазин, калий, 1-(2-гидроксиэтил)пирролидин, натрий, триэтаноламин, трометамин и соли цинка. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные соли по настоящему изобретению включают, помимо прочего, соли Na, Ca, K, Mg, Zn или других металлов. В некоторых вариантах предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, 2,2-дихлоруксусную кислоту, 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту, 2-оксоглутаровую кислоту, 4-ацетамидобензойную кислоту, 4-аминосалициловую кислоту, уксусную кислоту, адипиновую кислоту, l-аскорбиновую кислоту, l-аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, (+)- камфорную кислоту, (+)-камфор-10-сульфокислоту, каприновую кислоту (декановая кислота), капроновую кислоту (гексановая кислота), каприловую кислоту (октановая кислота), угольную кислоту, коричную кислоту, лимонную кислоту, цикламиновую кислоту, додецилсульфоновую кислоту, этан-1,2-дисульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, галактаровую кислоту, гентизиновую кислоту, dглюкогептоновую кислоту, dглюконовую кислоту, dглюкуроновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутаровую кислоту, глицерофосфорную кислоту, гликолевую кислоту, гиппуровую кислоту, бромистоводородную кислоту, соляную кислоту, изомасляную кислоту, молочную кислоту, лактобионовую кислоту, лауриновую кислоту, малеиновую кислоту, l-яблочную кислоту, малоновую кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, нафталин-1,5-дисульфоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, никотиновую кислоту, азотную кислоту, олеиновую кислоту, щавелевую кислоту, пальмитиновую кислоту, памовую кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, l-пироглутаминовую кислоту, салициловую кислоту, себациновую кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту, серную кислоту, lвинную кислоту, тиоциановую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, трифторуксусную кислоту и соли ундециленовой кислоты.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот также могут существовать в виде различных сольватов, таких как вода, метанол, этанол, диметилформамид и тому подобное. Могут быть также приготовлены смеси таких сольватов. Источником такого сольвата может быть растворитель кристаллизации, принадлежащий к растворителю для приготовления или кристаллизации или случайный для такого растворителя.

В композициях также могут присутствовать увлажняющие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивные агенты, покрытия, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) металлохелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

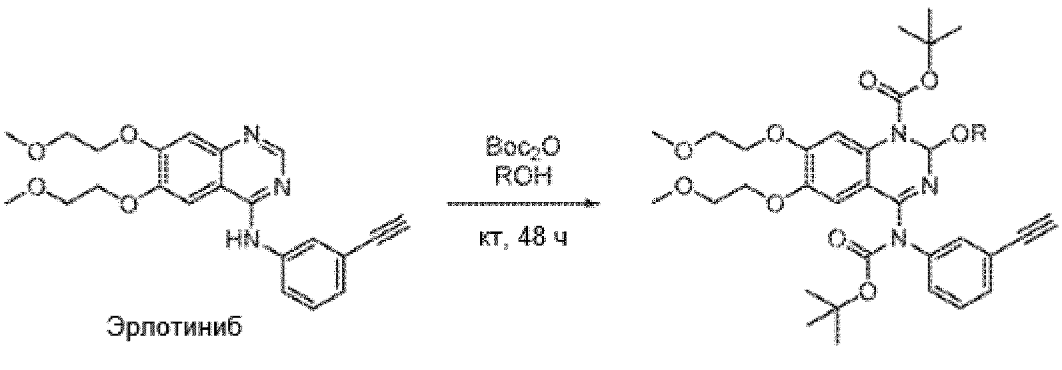
Примеры

Теперь изобретение, в целом описываемое, будет более легко понято со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1: Получение иллюстративных соединений серии JGK

Общие процедуры. Соединения серии JGK могут быть получены способами, описанными ниже, или любым другим подходящим способом. Соединения серии JGK иногда упоминаются в данном документе с префиксом JCN. Все реакции обычно проводили в инертной атмосфере аргона. Если не указано иное, материалы были получены от коммерческих поставщиков и использовались без очистки. Все растворители были очищены и высушены стандартными методами непосредственно перед использованием. ТГФ и Et_2O были недавно перегнаны из натрия и бензофенона. Метиленхлорид, толуол и бензол очищали нагреванием с обратным холодильником с CaH_2. Реакции проверяли с помощью тонкослойной хроматографии (Kieselgel 60 F254, Merck). Пятна были обнаружены при просмотре в УФ-свете и окрашивании с помощью обугливания после погружения в раствор *п*-анизальдегида или раствор фосфорномолибденовой кислоты. При водной обработке все органические растворы сушили над безводным сульфатом магния и фильтровали перед роторным испарением при давлении водяного насоса. Неочищенные соединения очищали колоночной хроматографией на силикагеле (SilicaFlash P60, 230-400 меш, SiliCycle Inc). Спектры ЯМР протонов (^1H) и углерода (^{13}C) получали на спектрометре Bruker AV 400 (400/100 МГц) или Bruker AV500 (500/125 МГц). Химические сдвиги представлены в единицах ppm с Me_4Si или $CHCl_3$ в качестве внутреннего стандарта. Шаблоны расщепления обозначаются: s, синглет; d, дублет; t, триплет; m, мультиплет; b, широкий. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения были получены с использованием Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с источником IonSense ID-CUBE DART.

Получение JGK001, JGK003



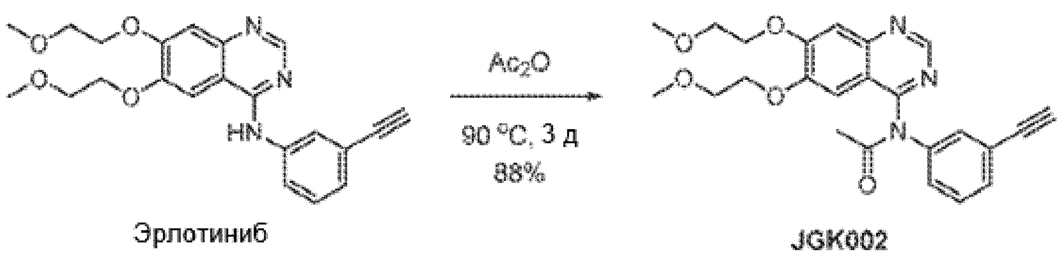
JGK001 (R = Me, 73%)
JGK003 (R = Et, 71%)

[JGK001] В раствор эрлотиниба (134 мг, 0,3406 ммоль) в безводном метаноле (5,0 мл) добавляли ди-*трет*-бутилдикарбонат (228 мг, 1,7029 ммоль) одной порцией при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 48 ч. и концентрировали *в вакууме*. Реакционную смесь разбавляли с помощью H_2O (30 мл) и EtOAc (30 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 × 30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO4, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, 3/1) с получением **JGK001** (156 мг, 73%); ^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,86 (с, 1 H), 7,43 (с, 1 H), 7,20-7,23 (м, 2 H), 7,16 (тд, *J*=1,2, 7,6 Гц, 1 H), 7,09 (д,

J=8,0 Гц, 1 H), 4,16-4,25 (м, 4 H), 3,80 (т, J=5,2 Гц, 2 H), 3,77 (т, J=5,2 Гц, 2 H), 3,45 (с, 3 H), 3,44 (с, 3 H), 3,44 (с, 3 H), 3,03 (с, 1 H), 1,55 (с, 9 H), 1,11 (с, 9 H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 152,1, 151,5, 149,2, 148,8, 145,7, 142,7, 130,6, 128,9, 127,4, 125,3, 122,6, 121,5, 114,7, 111,4, 108,0, 90,7, 83,7, 83,3, 82,9, 76,8, 70,9, 70,7, 68,8, 68,7, 59,2, 59,1, 55,0, 28,2, 27,3; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 626,3061 [рассч. для $C_{33}H_{43}N_3O_9$ 625,2993].

[JGK003] В раствор эрлотиниба (101 мг, 0,2567 ммоль) в безводном этаноле (2,6 мл) добавляли ди-*трет*-бутилдикарбонат (172 мг, 1,2836 ммоль) одной порцией при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 48 ч. и концентрировали *в вакууме*. Реакционную смесь разбавляли с помощью H_2O (30 мл) и EtOAc (30 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 × 30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO4, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, 3/1) с получением **JGK003** (117 мг, 71%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,86 (с, 1 H), 7,43 (с, 1 H), 7,34 (с, 1 H), 7,21-7,24 (м, 2 H), 7,16 (д, J=7,6 Гц, 1 H), 7,10 (д, J=7,6 Гц, 1 H), 4,17-4,25 (м, 4 H), 3,61-3,82 (м, 6 H), 3,46 (с, 3 H), 3,45 (с, 3 H), 3,02 (с, 1 H), 1,55 (с, 9 H), 1,23 (т, J=6,8 Гц, 3 H), 1,12 (с, 9 H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 152,0, 151,4, 149,2, 148,9, 145,5, 143,0, 130,8, 128,8, 127,3, 125,3, 122,5, 121,7, 114,7, 111,3, 107,9, 89,3, 83,7, 83,2, 82,8, 76,7, 70,9, 70,7, 68,8, 68,6, 63,0, 59,2, 59,1, 28,2, 27,4, 14,6; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 640,3211 [рассч. для $C_{34}H_{45}N_3O_9$ 639,3150].

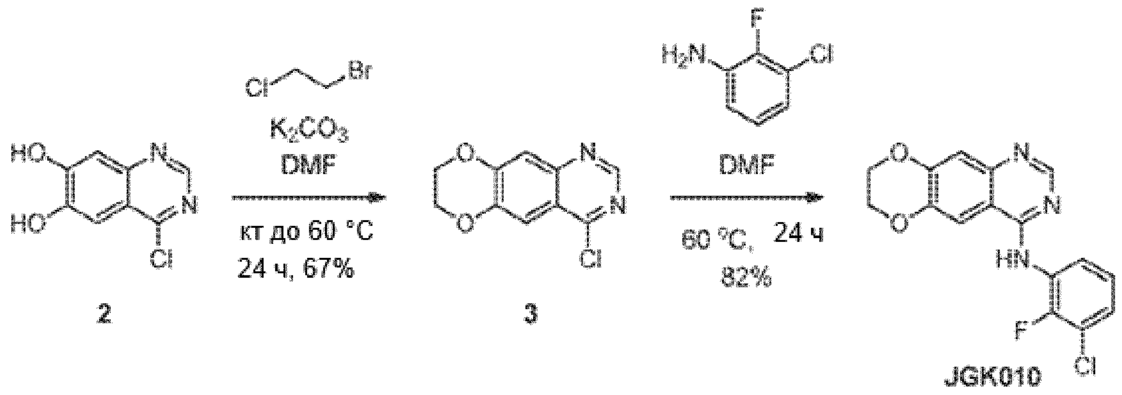
Получение JGK002



К твердому эрлотинибу (165 мг, 0,4194 ммоль) добавляли ангидрид уксусной кислоты (5,0 мл). После нагревания при 90 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 3 дней реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, нейтрализовали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (20 мл) и разбавляли с помощью EtOAc (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 × 30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 1/1 до 1/3) с получением **JGK002** (161 мг, выделенный выход 88%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 9,06 (с, 1 H,), 7,45 (т, J=1,6 Гц, 1 H,), 7,37-7,39 (м, 2 H), 7,36 (с, 1 H), 7,30-7,34 (м, 1 H), 7,15 (с, 1 H), 4,32 (т, J=4,8 Гц, 2 H), 4,16 (т, J=4,8 Гц, 2

H), 3,86 (т, J=4,8 Гц, 2 H), 3,79 (т, J=4,8 Гц, 2 H), 3,46 (с, 3 H), 3,45 (с, 3 H), 3,06 (с, 1 H), 2,14 (с, 3 H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 170,5, 158,8, 156,1, 153,5, 151,1, 150,8, 141,0, 130,9, 130,3, 129,3, 127,5, 123,4, 117,2, 107,9, 103,1, 82,4, 78,4, 70,6, 70,3, 68,9, 68,7, 59,3, 59,3, 23,7; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 436,1811 [рассч. для $C_{24}H_{25}N_3O_5$ 435,1788].

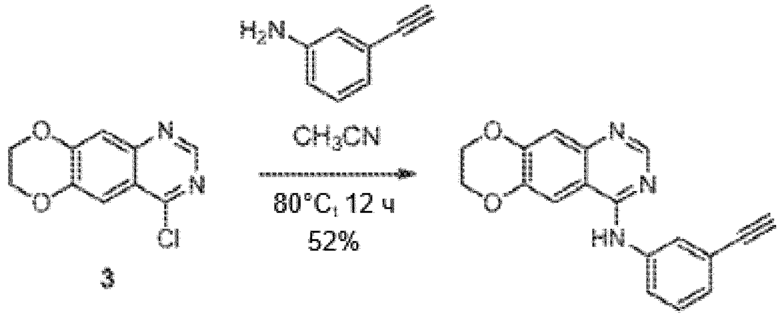
Получение JGK010, JGK032. ***Общая процедура для замещения аналогами анилина***



[Циклизация] В раствор диола **2** (530 мг, 2,6959 ммоль) в DMF (13,5 мл, 0,2 M) добавляли одной порцией карбонат калия (1490 мг) с последующим последовательным добавлением по каплям 1-бром-2-хлорэтана (1,3 мл) при комнатной температуре в атмосфере Ar. После нагревания при 60 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 24 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, гасили с помощью H_2O (50 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO4, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 6/1 до 3/1) с получением слитого хлорхиназолина **3**□(404 мг, 67%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,84 (с, 1 H), 7,64 (с, 1 H), 7,47 (с, 1 H), 4,43-4,45 (м, 2 H), 4,39-4,42 (м, 2 H). [известное соединение; Chilin, A. *et al. J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1862-1866]

[JGK010] В раствор слитого хлорхиназолина **3** (114 мг, 0,5120 ммоль) в DMF (2,6 мл) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,10 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 60 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 24 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли с помощью Et_2O (30,0 мл) с получением белой суспензии. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью Et_2O (2 × 50 мл) и собирали с получением **JGK010** (140 мг, 82%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,68 (с, 1 H), 8,59 (ддд, J=3,2, 6,8, 6,8 Гц, 1 H), 7,39 (с, 1 H), 7,34 (с, 1 H), 7,29 (с, 1 H), 7,10-7,18 (м, 2 H), 4,38-4,43 (м, 4 H); ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,78 (с, 1 H), 8,79 (с, 1 H), 8,45 (с, 1 H), 7,62 (т, J=7,0 Гц, 1 H), 7,50 (т, J=7,0 Гц, 1 H), 7,43 (с, 1 H), 7,34 (т, J=8,0 Гц, 1 H), 4,46-4,53 (м, 2 H), 4,40-4,52 (м, 2 H) ; ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ 159,8, 154,0, 152,2, 149,9, 145,7, 135,2, 129,9, 128,1, 126,4, 125,8, 120,9, 111,3, 108,1, 105,8, 65,5, 64,6; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 332,0551 [рассч. для $C_{16}H_{11}ClFN_3O_2$ 331,0518].

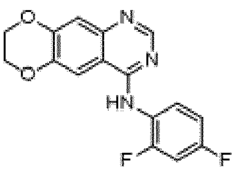
Получение JGK005



JGK005

В раствор слитого хлорхиназолина **3** (14 мг, 0,0628 ммоль) в CH_3CN (2,0 мл) по каплям добавляли 3-этиниланилин (0,05 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 80 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, 3/1) с получением **JGK005**□(10 мг, 52%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 9,45 (с, 1 H), 8,43 (с, 1 H), 8,04-8,05 (м, 2 H), 7,87-7,90 (м, 1 H), 7,34 (т, *J*=7,9 Гц, 1 H), 7,14-7,16 (м, 2 H), 4,35-4,39 (м, 4 H), 4,14 (с, 1 H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d_6) δ 156,8, 153,3, 149,5, 146,5, 144,1, 140,2, 129,3, 126,7, 124,9, 122,7, 122,1, 113,0, 110,4, 108,8, 84,0, 80,9, 64,9, 64,6; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 304,1079 [рассч. для $C_{18}H_{13}N_3O_2$ 303,1002].

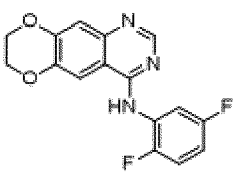
JGK025



JGK025

Получение **JGK025** проводили согласно общей процедуре; **JGK025** (25%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,30 (с, 1 H), 8,73 (с, 1 H), 8,28 (с, 1 H), 7,51-7,58 (м, 1 H), 7,41-7,48 (м, 1 H), 7,35 (с, 1 H), 7,17-7,23 (м, 1 H), 4,44-4,50 (м, 2 H), 4,39-4,44 (м, 2 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ 161,6 (*J*=245,9 Гц), 160,0, 157,6 (*J*=249,6 Гц), 152,1, 150,1, 145,6, 135,4, 130,4, 121,4, 112,4, 110,9, 108,1, 108,1, 105,4, 65,5, 64,6; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 316,0890 [рассч. для $C_{16}H_{11}F_2N_3O_2$ 315,0813].

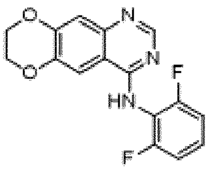
JGK026



JGK026

Получение **JGK026** проводили согласно общей процедуре; **JGK026** (22%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,09 (с, 1 H), 8,74 (с, 1 H), 8,18 (с, 1 H), 7,39-7,51 (м, 2 H), 7,30 (с, 1 H), 7,23-7,29 (м, 1 H), 4,45-4,49 (м, 2 H), 4,40-4,44 (м, 2 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ 159,8, 158,1 (*J*=239,6 Гц), 153,7 (*J*=243,2 Гц), 152,1, 150,1, 145,7, 135,7, 126,0, 117,9, 117,8, 116,0, 110,9, 108,2, 106,2, 65,5, 64,6; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 316,0893 [рассч. для $C_{16}H_{11}F_2N_3O_2$ 315,0813].

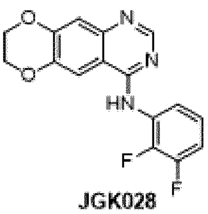
JGK027



JGK027

Получение **JGK027** проводили согласно общей процедуре; **JGK027** (6%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,23 (bs, 1 H), 8,75 (с, 1 H), 8,29 (с, 1 H), 7,91 (с, 1 H), 7,46-7,55 (м, 1 H), 7,29 (т, *J*=8,1 Гц, 2 H), 4,46-4,50 (м, 2 H), 4,40-4,46 (м, 2 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ 163,6, 160,7, 160,4, 158,4, 152,5, 151,5, 146,2, 130,6, 115,6, 113,5, 113,4, 111,9, 109,3, 108,2, 66,2, 65,3; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 316,0889 [рассч. для $C_{16}H_{11}F_2N_3O_2$ 315,0813].

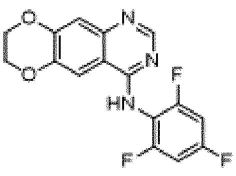
JGK028



JGK028

Получение **JGK028** проводили согласно общей процедуре; **JGK028** (41%); ^{1}H ЯМР (500 МГц, MeOD) δ 8,64 (с, 1 H), 8,03 (с, 1 H), 7,31-7,38 (м, 2 H), 7,24-7,31 (м, 2 H), 4,50-4,55 (м, 2 H), 4,44-4,50 (м, 2 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ 160,1, 152,8, 150,9 (*J*=245,6 Гц), 149,0, 146,2, 145,9 (*J*=249,7 Гц), 134,6, 126,0, 124,0, 123,1, 116,2, 109,8, 107,8, 105,0, 65,2, 64,2; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 316,0884 [рассч. для $C_{16}H_{11}F_2N_3O_2$ 315,0813].

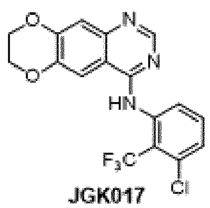
JGK029



JGK029

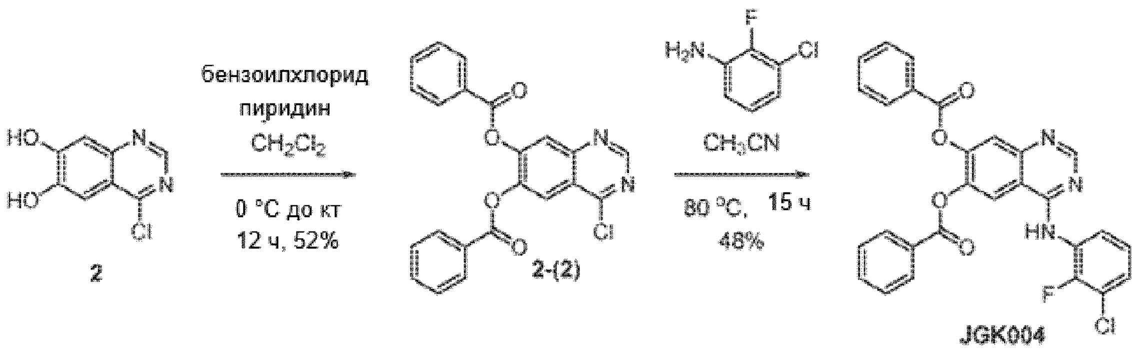
Получение **JGK029** проводили согласно общей процедуре; **JGK029** (52%); ^{1}H ЯМР (500 МГц, MeOD) δ 8,60 (с, 1 H), 7,98 (с, 1 H), 7,29 (с, 1 H), 7,07-7,13 (м, 2 H), 4,50-4,53 (м, 2 H), 4,44-4,48 (м, 2 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ 161,7, 160,3, 158,6, 158,1, 153,2, 150,3, 144,4, 143,7, 117,2, 113,8, 113,0, 112,3, 109,5, 101,5, 65,3, 64,5; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 334,0794 [рассч. для $C_{16}H_{10}F_3N_3O_2$ 333,0719].

JGK017


JGK017

Получение **JGK017** проводили согласно общей процедуре; **JGK017** (5%); [1]H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,59 (с, 1 H), 8,15 (д, *J*=8,3 Гц, 1 H), 7,49 (т, *J*=8,1 Гц, 1 H), 7,38 (с, 1 H), 7,34 (д, *J*=7,9 Гц, 1 H), 7,21 (с, 1 H), 4,41-4,42 (м, 2 H), 4,38-4,40 (м, 2 H); [13]C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 156,4, 153,2, 149,7, 146,7, 144,5, 138,4, 133,5, 132,2, 128,2, 125,4, 119,9, 119,7, 114,3, 110,4, 105,7, 64,5, 64,3.

Получение JGK004

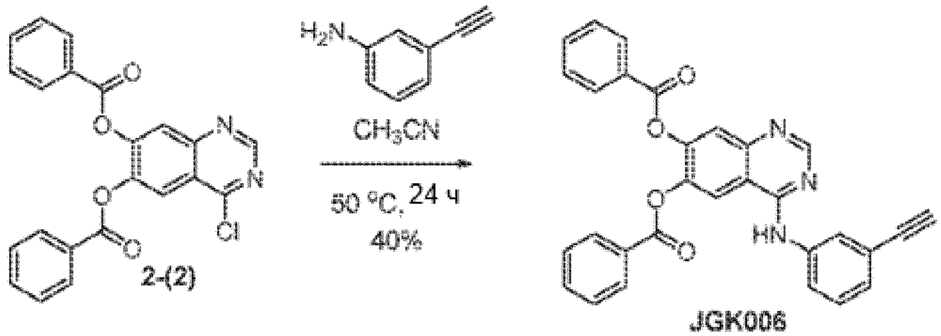


[Бензоилирование] К холодному (0 °С) раствору диола **2** (205 мг, 1,0428 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (5,2 мл, 0,2 М) по каплям последовательно добавляли пиридин (0,5 мл) и бензоилхлорид (0,7 мл) в атмосфере Ar. После перемешивания при комнатной температуре в течение 12 ч. реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором NH_4Cl (20 мл) и разбавляли с помощью CH_2Cl_2 (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (2 × 50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, 10/1) с получением бензоилхлорхиназолина **2-(2)** (220 мг, 52%); [1]H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 9,07 (с, 1 H), 8,31 (с, 1 H), 8,16 (с, 1 H), 8,04-8,07 (м, 4 H), 7,53-7,58 (м, 2 H), 7,34-7,39 (м, 4 H).

[JGK004] В раствор бензоилхлорхиназолина **2-(2)** (180 мг, 0,444 ммоль) в CH_3CN (3,0 мл) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,06 мл, 0,533 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания при 80 °С (температура бани) с перемешиванием в течение 15 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, 3/1) с получением **JGK004**□(109 мг, 48%); [1]H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,85 (с, 1 H), 8,48-8,53 (м, 1 H), 8,08 (т, *J*=7,2 Гц, 4 H), 7,99 (д, *J*=3,2 Гц, 2 H), 7,51-7,59 (м, 3 H), 7,39 (дд, *J*=8,4, 16,0 Гц, 4 H), 7,16-7,21 (м, 2 H); [13]C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 164,2, 163,7, 156,6, 155,1, 150,6, 149,1, 148,6, 147,5, 142,1, 134,1, 134,1, 130,3, 130,2, 128,6, 128,6, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 125,3, 124,6, 124,5, 122,9, 121,6, 121,0, 120,9, 114,4, 113,3; МСВР-ИЭР

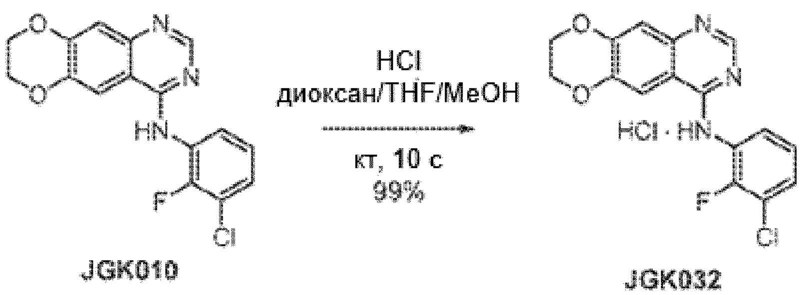
[M+H]+ обнаружено 514,0963 [рассч. для $C_{28}H_{17}ClFN_3O_4$ 513,0886].

Получение JGK006



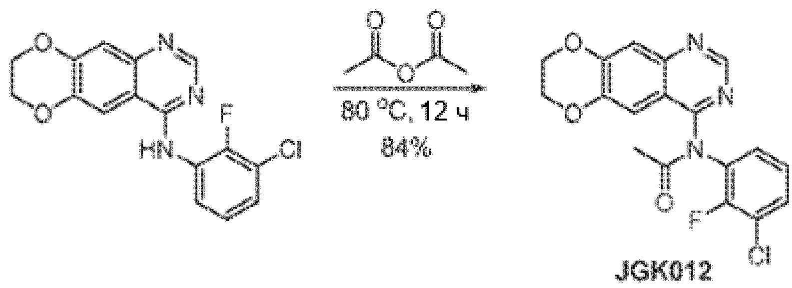
В раствор бензоилхлорхиназолина **2-(2)** (100 мг, 0,247 ммоль) в CH_3CN (3,0 мл) по каплям добавляли 3-этиниланилин (0,05 мл, 0,430 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания при 50 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 24 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, 4/1) с получением **JGK006**(48 мг, 40%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,71 (с, 1 H), 8,03 (д, *J*=8,0 Гц, 2 H), 7,96 (с, 1 H), 7,90-7,95 (м, 2 H), 7,79 (с, 1 H), 7,62-7,75 (м, 3 H), 7,55 (т, *J*=7,3 Гц, 1 H), 7,48 (т, *J*=7,5 Гц, 1 H), 7,37 (т, *J*=7,4 Гц, 2 H), 7,22-7,31 (м, 4 H), 3,04 (с, 1 H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 164,8, 163,9, 156,7, 155,3, 148,9, 146,9, 141,3, 138,1, 134,1, 134,0, 130,3, 130,1, 128,9, 128,6, 128,5, 128,1, 128,0, 127,9, 124,8, 122,7, 122,4, 122,1, 115,1, 113,1, 83,3; МСВР-ИЭР [M+H]+ обнаружено 486,1443 [рассч. для $C_{30}H_{19}N_3O_4$ 485,1370]

Получение JGK032



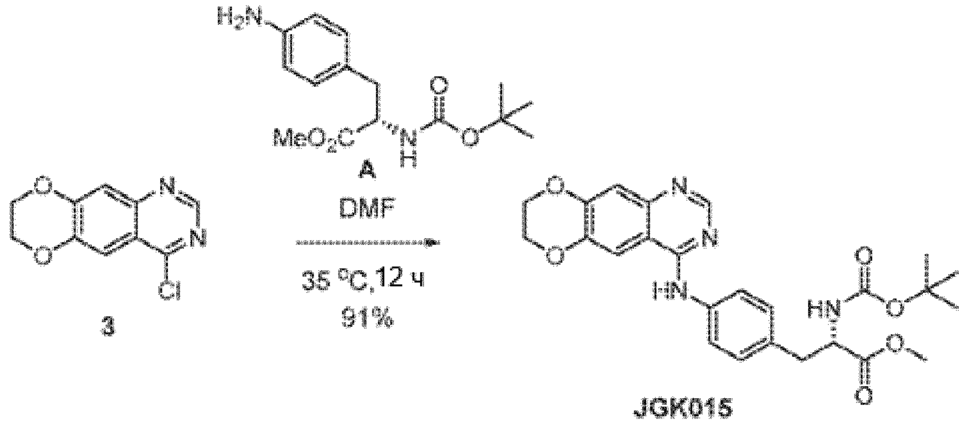
1,0 M раствор хлороводорода получали путем добавления раствора хлороводорода (0,1 мл, 4,0 M в диоксане, 0,4 ммоль) в ТГФ (0,3 мл) при комнатной температуре. В раствор **JGK010** (6,1 мг, 0,01839 ммоль) в MeOH по каплям добавляли образованный выше раствор хлороводорода (0,030 мл, 0,030 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 10 секунд реакционную смесь концентрировали *в вакууме* с получением **JGK032** (6,7 мг, 99%); ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,63 (с, 1 H), 8,81 (с, 1 H), 8,36 (с, 1 H), 7,63 (ддд, *J*=1,6, 6,9, 8,3 Гц, 1 H), 7,39 (с, 1 H), 7,35 (ддд, *J*=1,1, 8,1, 16,2 Гц, 1 H), 4,49-4,51 (м, 2 H), 4,43-4,45 (м, 2 H).

Получение JGK012



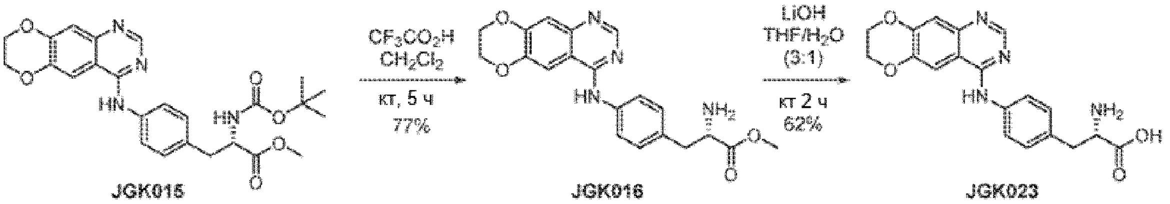
К твердому **JGK010** (39 мг, 0,1176 ммоль) добавляли ангидрид уксусной кислоты (5,0 мл). После нагревания при 80 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, нейтрализовали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (20 мл) и разбавляли с помощью EtOAc (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 × 30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 2/1 до 1/1) с получением **JGK012** (37 мг, выделенный выход 84%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 9,01 (с, 1 H), 7,49 (с, 1 H), 7,44 (с, 1 H), 7,31-7,41 (м, 2 H), 7,09 (т, *J*=8,0 Гц, 1 H), 4,41-4,43 (м, 2 H), 4,37-4,40 (м, 2 H), 2,15 (с, 3 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 170,2, 159,2, 153,3, 151,3, 149,7, 145,8, 130,6, 129,8, 129,7, 124,7, 122,5, 122,4, 117,7, 113,6, 109,2, 64,5, 64,2, 22,9; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 374,0701 [рассч. для $C_{18}H_{13}ClFN_3O_3$ 373,0623].

Получение JGK015



В раствор аналога L-аминокислоты **A** (227 мг, 0,7712 ммоль) в DMF (3,0 мл) добавляли одной порцией слитый хлорхиназолин **3** (117 мг, 0,5932 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания при 35 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли насыщенным солевым раствором (30,0 мл) и EtOAc (30,0 мл) с получением желтой суспензии. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 × 50 мл). Объединенные органические слои концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, CH_2Cl_2/MeOH, от 40/1 до 10/1) с получением **JGK015** (261 мг, 92%); ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,57 (с, 1 H), 7,64 (с, 1 H), 7,61 (д, *J*=8,0 Гц, 2 H), 7,37 (с, 1 H), 7,27 (с, 1 H), 7,08 (д, *J*=8,5 Гц, 2 H), 5,09 (д, *J*=7,5 Гц, 1 H), 4,54 (дд, *J*=6,0, 13,5 Гц, 1 H), 4,31-4,33 (м, 2 H), 4,27-4,29 (м, 2 H), 3,68 (с, 3 H), 3,06 (дд, *J*=5,6, 14,0 Гц, 1 H), 3,00 (дд, *J*=6,1, 13,8 Гц, 1 H), 1,39 (с, 9 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 172,4, 156,5, 155,2, 153,6, 149,1, 146,3, 143,8, 137,6, 131,6, 129,7, 121,7, 113,8, 110,3, 106,6, 80,0, 64,4, 64,2, 54,4, 52,2, 37,6, 28,3; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 481,2082 [рассч. для $C_{25}H_{28}N_4O_6$ 480,2003].

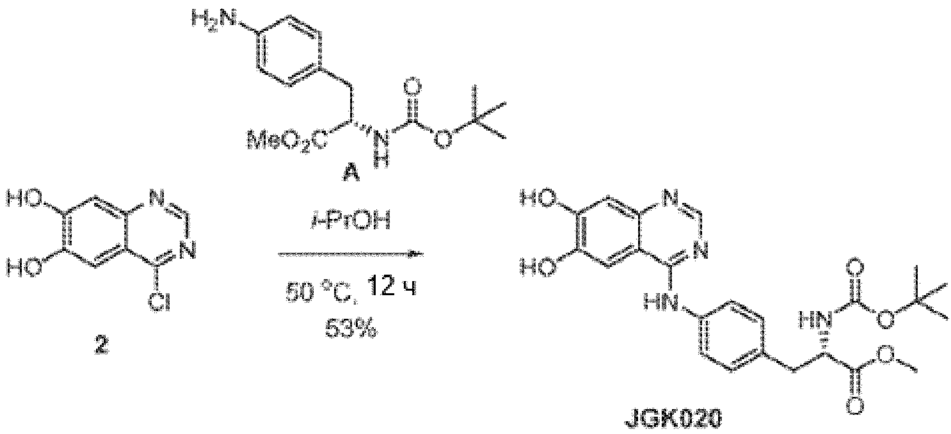
Получение JGK016, JGK023



[JGK016 (снятие защиты Boc)] В раствор **JGK015** (121 мг, 0,251 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (5 мл, 0,05 М) по каплям добавляли трифторуксусную кислоту (1,0 мл) при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 5 ч. реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (20 мл) и разбавляли с помощью CH_2Cl_2 (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (2 × 30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, CH_2Cl_2/MeOH, 20/1) с получением **JGK016** (74 мг, 77%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 10,5 (с, 1 H), 8,68 (с, 1 H), 8,43 (с, 2 H), 8,20 (с, 1 H), 7,68 (д, *J*=8,4 Гц, 2 H), 7,26 (д, *J*=8,4 Гц, 2 H), 7,23 (с, 1 H), 4,44-4,46 (м, 2 H), 4,39-4,41 (м, 2 H), 3,68 (с, 3 H), 3,03-3,13 (м, 2 H); ^{1}H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,26 (с, 1 H), 7,73 (с, 1 H), 7,60 (д, *J*=8,4 Гц, 2 H), 7,17 (д, *J*=8,4 Гц, 2 H), 7,08 (с, 1 H), 4,31-4,35 (м, 4 H), 3,72 (т, *J*=6,6 Гц, 1 H), 3,68 (с, 3 H), 3,27-3,29 (м, 1 H), 3,01 (дд, *J*=5,9, 13,6 Гц, 1 H), 2,89 (дд, *J*=7,0, 13,5 Гц, 1 H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) δ 174,4, 157,4, 152,6, 149,7, 145,0, 144,2, 137,5, 132,8, 129,2, 122,8, 122,3, 111,5, 110,1, 107,9, 64,5, 64,1, 55,2, 51,0, 39,5; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 381,1553 [рассч. для $C_{20}H_{20}N_4O_4$ 380,1479].

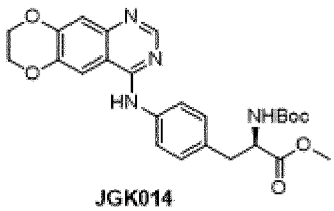
[JGK023 (гидролиз)] В холодный (0 °C) раствор **JGK016** (42 мг, 0,1104 ммоль) в ТГФ/H_2O (3:1, всего 4,0 мл) добавляли одной порцией гидроксид лития (14 мг). После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 ч. реакционную смесь нейтрализовали с помощью 1 н. HCl и разбавляли с помощью EtOAc (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (100 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO4, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, CH_2Cl_2/MeOH, от 30/1 до 15/1) с получением **JGK023**(25 мг, 62%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,62 (с, 1 H), 8,12 (с, 1 H), 7,71 (д, J=8,4 Гц, 2 H), 7,40 (д, J=8,4 Гц, 2 H), 7,24 (с, 1 H), 4,48-4,50 (м, 2 H), 4,42-4,44 (м, 2 H), 4,28 (т, J=6,8 Гц, 1 H), 3,32-3,37 (м, 1 H), 3,20 (дд, J=7,6, 14,8 Гц, 1 H); ^{13}C NMR (125 МГц, $CDCl_3$) δ 169,7, 159,1, 152,4, 148,8, 146,0, 136,1, 134,1, 133,1, 129,7, 129,7, 124,8, 124,8, 110,0, 108,1, 104,9, 65,2, 64,2, 53,6, 35,4; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 367,1334 [рассч. для $C_{19}H_{18}N_4O_4$ 366,1322].

Получение JGK020



В раствор хлорхиназолина **2** (104 мг, 0,5294 ммоль) в изопропиловом спирте (5,3 мл) по каплям добавляли аминокислоту (187 мг) при комнатной температуре. После нагревания при 50 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 5/1 до 3/1) с получением **JGK020** (128 мг, 53%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 10,68 (с, 1 H), 10,22 (шир., 1 H), 8,64 (с, 1 H), 7,91 (с, 1 H), 7,53 (д, J=8,4 Гц, 2 H), 7,26-7,31 (м, 4 H), 4,12-4,18 (м, 1 H), 3,59 (с, 3 H), 2,98 (дд, J=5,2, 14,0 Гц, 1 H), 2,84 (дд, J=10,0, 13,2 Гц, 1 H), 1,30 (с, 9 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ 173,0, 158,2, 155,9, 155,6, 148,7, 148,4, 136,1, 135,8, 129,7, 124,7, 107,6, 107,3, 103,3, 78,8, 55,7, 52,3, 36,3, 28,6; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 455,1920 [рассч. для $C_{23}H_{26}N_4O_6$ 454,1846].

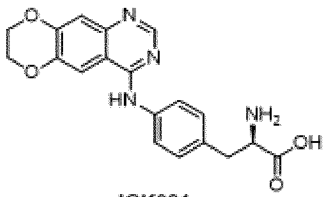
JGK014



JGK014

JGK014 (26%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,62 (с, 1 H), 7,66 (д, J=8,4 Гц, 2 H), 7,35 (с, 1 H), 7,16 (д, J=8,4 Гц, 2 H), 4,99 (д, J=7,6 Гц, 1 H), 4,56-4,62 (м, 1 H), 4,36-4,42 (м, 4 H), 3,73 (с, 3 H), 3,03-3,15 (м, 2 H), 1,43 (с, 9 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 172,4, 156,5, 155,2, 153,6, 149,1, 146,3, 143,8, 137,6, 131,6, 129,7, 121,7, 113,8, 110,3, 106,6, 80,0, 64,4, 64,2, 54,4, 52,2, 37,6, 28,3; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 481,2080 [рассч. для $C_{25}H_{28}N_4O_6$ 480,2003].

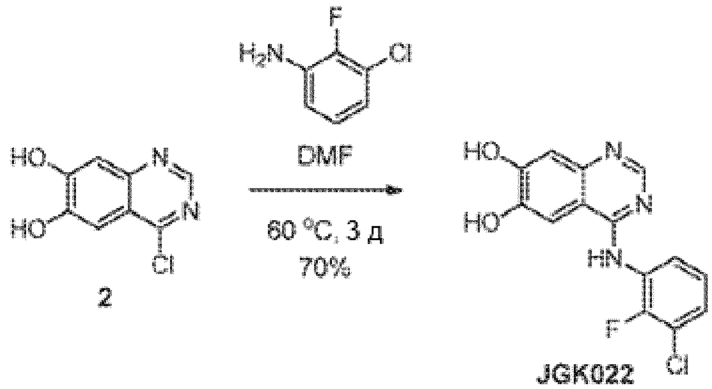
JGK021



JGK021

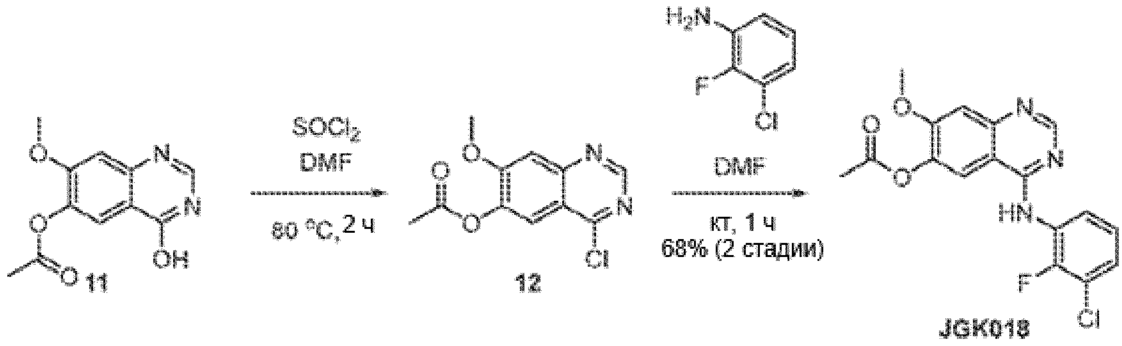
Получение **JGK021** проводили согласно процедуре синтеза **JGK023**; ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,62 (с, 1 H), 8,12 (с, 1 H), 7,71 (д, *J*=8,4 Гц, 2 H), 7,40 (д, *J*=8,4 Гц, 2 H), 7,24 (с, 1 H), 4,48-4,50 (м, 2 H), 4,42-4,44 (м, 2 H), 4,28 (т, *J*=6,8 Гц, 1 H), 3,32-3,37 (м, 1 H), 3,20 (дд, *J*=7,6, 14,8 Гц, 1 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 169,7, 159,1, 152,4, 148,8, 146,0, 136,1, 134,1, 133,1, 129,7, 129,7, 124,8, 124,8, 110,0, 108,1, 104,9, 65,2, 64,2, 53,6, 35,4; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 367,1347 [рассч. для $C_{19}H_{18}N_4O_4$ 366,1322].

Получение JGK022



В раствор диола **X** (121 мг, 0,6155 ммоль) в DMF (3,0 мл) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,14 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 60 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 3 дней реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли с помощью Et_2O (30,0 мл) с получением белой суспензии. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью Et_2O (3 × 50 мл) и CH_2Cl_2 (2 × 30 мл) и собирали с получением **JGK022** (132 мг, 70%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d₆*) δ 11,16 (шир., 1 H), 10,43 (шир., 1 H), 8,68 (с, 1 H), 7,91 (с, 1 H), 7,58 (т, *J*=7,1 Гц, 1 H), 7,48 (т, *J*=6,8 Гц, 1 H), 7,40 (с, 1 H), 7,30 (т, *J*=8,1 Гц, 1 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ 159,1, 156,4, 154,1, 152,1, 149,1, 148,3, 135,1, 129,7, 128,1, 126,8, 125,7, 120,8, 107,4, 106,9, 102,9; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 306,0437 [рассч. для $C_{14}H_9ClFN_3O_2$ 305,0361].

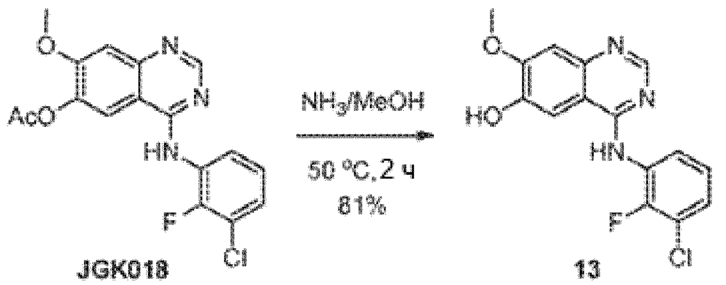
Получение JGK018



[**Хлорирование]** В раствор **11** (500 мг, 2,134 ммоль) в тионилхлориде (7,5 мл, 0,28 М) по каплям добавляли диметилформамид (0,15 мл). После нагревания при 80 °С (температура бани) с перемешиванием в течение 2 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали *в вакууме*. Остаток последовательно промывали с помощью Et_2O (200 мл) и немедленно использовали на следующей стадии.

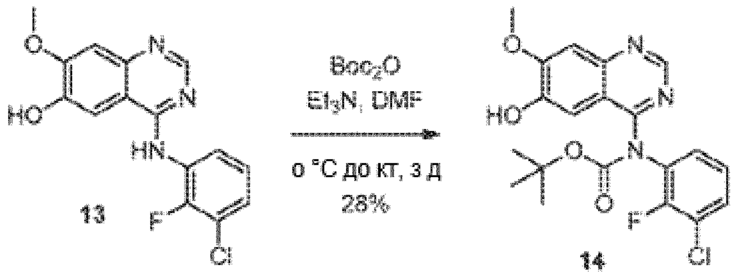
[Замещение] В раствор образованного выше хлорхиназолина **12** в безводном DMF (11 мл, 0,2 М) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,50 мл, 4,548 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере Ar. После перемешивания при такой же температуре в течение 1 ч. реакционную смесь разбавляли с помощью Et_2O (100,0 мл) с получением белой суспензии. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью Et_2O (2 × 50 мл) и собирали с получением **JGK018** (525 мг, 68%). Спектроскопические данные совпадали с таковыми Zhang, X. *et al J. Med. Chem.* 2015, *58*, 8200-8215.

Получение 13



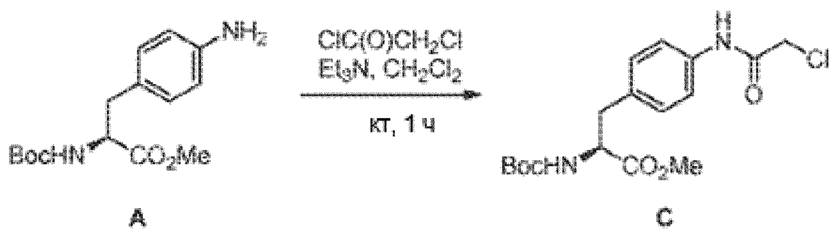
[Снятие защиты с ацетила] В **JGK018** (550 мг, 1,520 ммоль) по каплям добавляли раствор аммиака (8,0 мл, 7 н. в метаноле). После нагревания при 50 °С (температура бани) в герметичной пробирке с перемешиванием в течение 2 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали *в вакууме*. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью Et_2O (2 × 50 мл) и собирали с получением **13** (394 мг, 81%). Полученные спектроскопические данные совпадали с таковыми Zhang, X. *et al J. Med. Chem.* **2015**. *58*, 8200-8215,

Получение 14



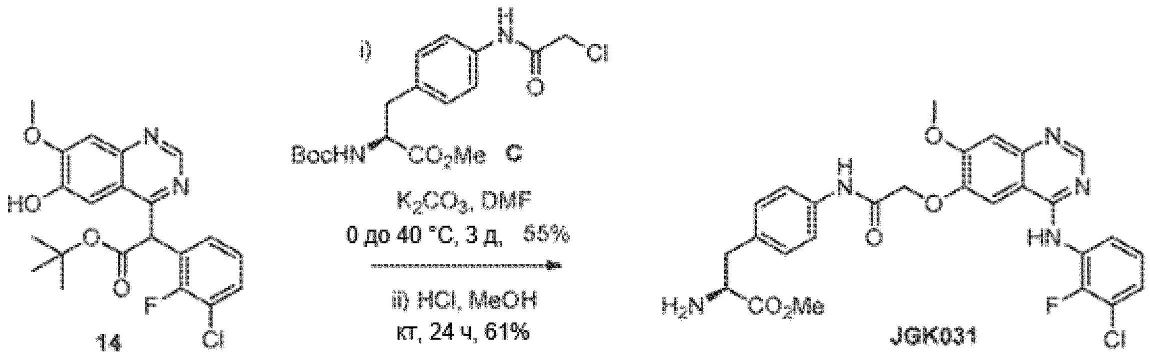
В холодный (0 °С) раствор **13** (113 мг, 0,353 ммоль) в безводном DMF (2 мл) по каплям добавляли триэтиламин (0,25 мл, 1,767 ммоль) с последующим добавлением по каплям ди-*трет*-бутилдикарбоната (62 мг, 0,459 ммоль) в безводном DMF (2 мл) в атмосфере Ar. После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 дней реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором H_2O (10 мл) и разбавляли с помощью EtOAc (10 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 × 50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 5/1 до 3/1) с получением **14** (42 мг, выделенный выход 28%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,69 (с, 1 H), 8,39-8,45 (м, 1 H), 7,64 (с, 1 H), 7,44 (с, 1 H), 7,11-7,16 (м, 2 H), 3,90 (с, 3 H), 1,59 (с, 9 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 156,2 (*J*=39,5 Гц), 154,9, 151,3, 150,3, 149,5 (*J*=224,1 Гц), 140,4, 128,1 (*J*=9,6 Гц), 124,8, 124,4 (*J*=4,8 Гц), 121,5, 120,8 (*J*=51,2 Гц), 113,5, 109,0, 108,8, 84,6, 56,2, 27,6;

Получение С



В раствор **A**[1] (56 мг, 0,1904 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (2 мл) по каплям добавляли триэтиламин (0,08 мл, 0,5712 ммоль) с последующим добавлением хлорацетилхлорида (0,05 мл, 0,6286 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере Ar. После перемешивания при такой же температуре в течение 1 ч. реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором NH_4Cl (20 мл) и разбавляли с помощью CH_2Cl_2 (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (2 × 30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

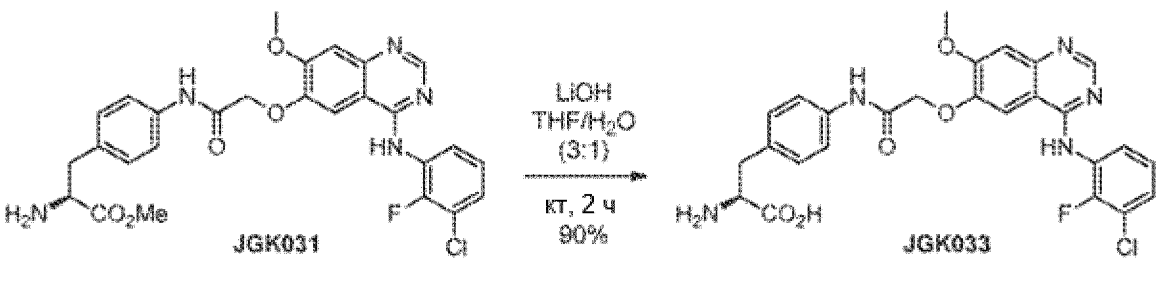
Получение JGK031



[Алкилирование] В холодный (0 °C) раствор **14** (44 мг, 0,1058 ммоль) в DMF (2,0 мл) добавляли одной порцией карбонат калия (73 мг, 0,528 ммоль) с последующим добавлением по каплям образованного выше **C** (0,1904 ммоль) в DMF (2,0 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 40 °C (температура бани) с перемешиванием в течение 3 дней реакционную смесь гасили с помощью H_2O (10 мл) и разбавляли с помощью EtOAc (10 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 × 50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 100/1 до 30/1) с получением алкилированного продукта **14-(2)** (43 мг, выделенный выход 55%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,16 (с, 1 H), 7,48 (д, *J*=8,4 Гц, 2 H), 7,44 (с, 1 H), 6,98-7,13 (м, 5 H), 6,34 (м, 1 H), 4,95 (д, *J*=7,4 Гц, 1 H), 4,54 (д, *J*=6,5 Гц, 1 H), 4,48 (с, 2 H), 3,69 (с, 6 H), 2,95-3,13 (м, 2 H), 1,53 (с, 9 H), 1,40 (с, 9 H).

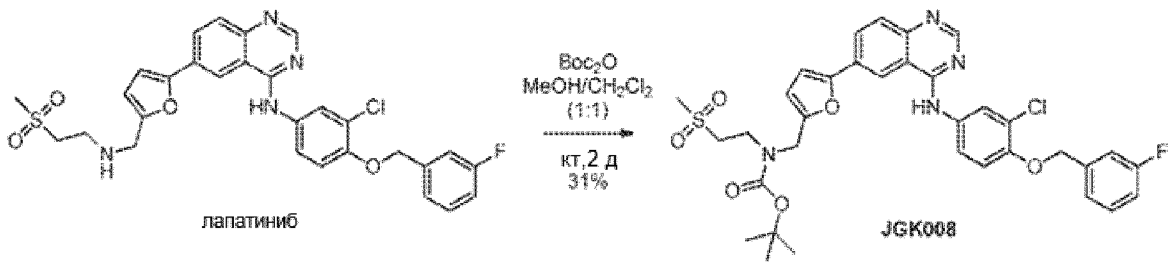
[Снятие защиты] В раствор алкилированного продукта **14-(2)** (26 мг, 0,0348 ммоль) в безводном MeOH (5,0 мл) по каплям добавляли 0,5 н. раствор хлороводорода (0,5 мл). После перемешивания при такой же температуре в течение 24 ч. реакционную смесь концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель с обращенной фазой, MeOH или MeOH/H_2O, 10/1) с получением **JGK031** (12 мг, 61%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8,20 (с, 1 H), 7,67 (с, 1 H), 7,49 (т, *J*=7,9 Гц, 2 H), 7,24-7,30 (м, 1 H), 7,11-7,21 (м, 4 H), 3,94 (с, 3 H), 3,59 (с, 3 H), 2,83-3,01 (м, 2 H); МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 554,1631 [рассч. для $C_{27}H_{25}ClFN_5O_5$ 553,1522].

Получение JGK033



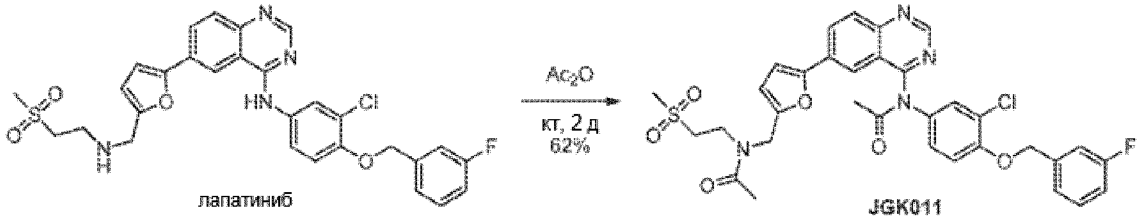
В раствор **JGK031** (5 мг, 0,009026 ммоль) в безводном ТГФ (6 мл) и H_2O (2 мл) добавляли гидроксид лития · H_2O (3 мг) одной порцией. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 ч. реакционную смесь нейтрализовали 1 н. раствором хлороводорода и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной обращенно-фазовой хроматографии (обращенно-фазовый силикагель, MeOH/H_2O, 5/1) с получением **JGK033**(4,4 мг, 90%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,16 (с, 1 H), 6,32 (с, 1 H), 6,03 (д, *J*=8,2 Гц, 2 H), 5,89-5,98 (м, 2 H), 5,59-5,79 (м, 4 H), 4,00 (с, 2 H), 2,51 (с, 3 H), 2,46 (т, *J*=5,6 Гц, 1 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ 163,9, 159,4, 157,2, 154,3, 152,1, 149,5, 137,1, 135,4, 129,7, 126,9, 124,6, 121,5, 120,3, 108,0, 106,9, 97,8, 56,6, 53,5, 35,6; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 540,1435 [рассч. для $C_{26}H_{23}ClFN_5O_5$ 539,1366].

Получение JGK008



В раствор лапатиниба (326 мг, 0,561 ммоль) в безводном MeOH (5,6 мл) и CH_2Cl_2 (5,6 мл) по каплям добавляли ди-*трет*-бутилдикарбонат (378 мг, 2,819 ммоль) одной порцией в атмосфере Ar. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 дней реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором H_2O (10 мл) и разбавляли с помощью CH_2Cl_2 (10 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (5 × 50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H_2O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 3/1 до 1/1) с получением **JGK008** (119 мг, выделенный выход 31%); ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,71 (bs, 1 H), 8,64 (с, 1 H), 8,44 (с, 1 H), 7,85-7,95 (м, 3 H), 7,68 (д, *J*=7,8 Гц, 1 H), 7,32-7,37 (м, 1 H), 7,21 (дд, *J*=8,4, 10,8 Гц, 2 H), 6,98-7,03 (м, 1 H), 6,96 (д, *J*=8,9 Гц, 1 H), 6,39 (д, *J*=47,1 Гц, 1 H), 5,13 (с, 2 H), 4,53 (д, *J*=32,2 Гц, 2 H), 3,99 (т, *J*=7,3 Гц, 2 H), 3,39 (д, *J*=66,1 Гц, 2 H), 2,89 (с, 3 H), 1,49 (с, 9 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 163,9, 162,0, 158,0, 154,2, 152,7, 151,7, 151,0, 139,1 (д, *J*=7,3 Гц), 132,4, 130,1 (д, *J*=8,1 Гц), 129,1, 128,6, 128,2, 125,1, 123,1, 122,4, 122,3, 115,4, 114,9 (д, *J*=21,0 Гц), 114,1 (д, *J*=13,9 Гц), 113,9, 111,5, 110,9, 107,7, 81,3, 70,9, 45,0, 43,6, 42,3, 41,4, 41,2, 28,4; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 681,1946 [рассч. для $C_{34}H_{34}ClFN_4O_6S$ 680,1866].

Получение JGK011



К твердому лапатинибу (68 мг, 0,353 ммоль) добавляли ангидрид уксусной кислоты (5,0 мл) в атмосфере Ar. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 дней реакционную смесь концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 3/1 до 1/3) с получением **JGK002** (48 мг, выделенный выход 62%); ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9,18 (с, 1 H), 8,10-8,17 (м, 3 H), 7,50 (д, *J*=2,5 Гц, 1 H), 7,27-7,36 (м, 2 H), 7,18 (дд, *J*=7,6, 13,8 Гц, 2 H), 6,97-7,03 (м, 2 H), 6,79 (д, *J*=3,3 Гц, 1 H), 6,44 (д, *J*=3,3 Гц, 1 H), 5,14 (с, 2 H), 4,66 (с, 2 H), 3,86 (т, *J*=6,6 Гц, 2 H), 3,30 (т, *J*=6,6 Гц, 2 H), 2,95 (с, 3 H), 2,33 (с, 3 H), 2,23 (с, 3 H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 171,4, 171,2, 163,9, 162,2, 162,0, 154,0, 153,7, 152,5, 151,0, 138,5 (*J*=7,3 Гц), 134,2, 130,8, 130,3, 130,2, 129,9, 129,1, 127,4, 123,9, 122,4 (*J*=2,9 Гц), 121,8, 118,0, 115,1, 115,0, 114,0 (*J*=5,2 Гц), 113,8, 111,1, 108,9, 70,1 (*J*=1,7 Гц), 52,3, 47,0, 41,4, 40,7, 23,7, 21,8; МСВР-ИЭР $[M+H]^+$ обнаружено 665,1628 [рассч. для $C_{33}H_{30}ClFN_4O_6S$ 664,1553].

Пример 2: Получение дополнительных иллюстративных соединений серии JGK

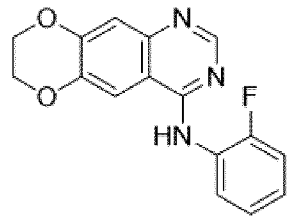
Общая химическая информация

Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Реакции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора CEM Discover. Реакции при комнатной температуре проводили при температуре окружающей среды (приблизительно 23°C). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60 F_{254} с пятнами, визуализированными УФ-светом (λ=254, 365 нм) или с использованием щелочного раствора $KMnO_4$. Колоночную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на SiO_2 60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при 25-50°C. Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса (^{1}H ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода (^{13}C ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР (*δ* ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные ^{1}H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm; множественность (с=синглет, д=дублет, т=триплет, к=квартет, quint=квинтет, м=мультиплет/смешанный тип, тд=триплет дублетов, ддд=дублет дублетов дублетов, шир.=широкий сигнал); постоянные взаимодействия (*J*) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР ^{13}C представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействия. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART. Соединения 4-хлор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолина (1), 4-хлорхиназолин-6,7-диола (2) и JGK010 получали, как указано выше.

Общая процедура А для синтеза 4-анилинохиназолиновых соединений JGK035-JGK041 и JKG043.

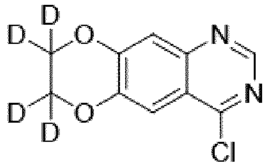
Смесь 4-хлорхиназолина (1 экв.) в *i*PrOH (0,1-0,3 М) обрабатывали с помощью анилина (1 экв.) и смесь нагревали при 80°C в условиях микроволнового излучения (60 Вт) в течение 15-20 мин. Смесь охлаждали до 23°C, обрабатывали дополнительным анилином (1 экв.) и снова подвергали микроволновому излучению (80°C, 60 Вт, 15-20 мин). Смесь либо концентрировали при пониженном давлении, или осажденную соль 4-анилинохиназолина гидрохлорида выделяли путем фильтрации (промывки холодным *i*PrOH). Остаток суспендировали в насыщ. водн. растворе $NaHCO_3$ и экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (3x). Объединенные органические экстракты промывали водой, солевым раствором, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали. Очистка посредством ФХ (элюирование градиентом CH_2Cl_2/EtOAc или гексаны/EtOAc) обеспечивала получение необходимых продуктов, обычно в виде от белого до грязно-белого или бледно-желтого твердых веществ.

***N*-(2-Фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK035).**



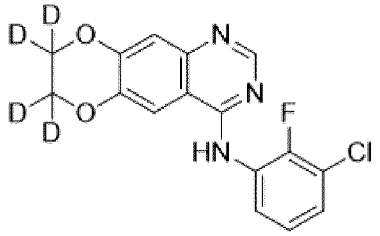
После общей процедуры А соединение JGK035 получали из 4-хлорхиназолина 1 (51 мг, 0,23 ммоль) и 2-фторанилина (40 мкл, 0,48 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ (CH_2Cl_2/EtOAc 10:1 → 10:4) обеспечивала получение JGK035 (56 мг, 82%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,68 (с, 1H), 8,64 (тд, *J*=8,2, 1,7 Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,36 (шир., 1H), 7,31 (с, 1H), 7,22 (т, *J*=7,5 Гц, 1H), 7,17 (ддд, *J*=11,2, 8,3, 1,5 Гц, 1H), 7,10-7,05 (м, 1H), 4,44-4,37 ppm (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 156,08, 153,60, 153,50 (д, *J*=242,7 Гц), 149,52, 146,65, 144,34, 127,31 (д, *J*=9,5 Гц), 124,66 (д, *J*=3,7 Гц), 123,97 (д, *J*=7,8 Гц), 122,89, 115,06 (д, *J*=19,3 Гц), 114,46, 110,62, 106,10, 64,69, 64,51 ppm. МСВР (DART): *m*/*z* $[M - H]^-$ рассч. для $C_{16}H_{11}FN_3O_2^-$, 296,0841; обнаружено 296,0841.

4-Хлор(7,7,8,8-$^2H_4$)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин (3).



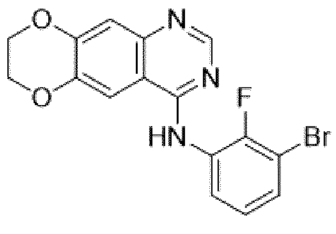
Раствор соединения 2 (193 мг, 0,98 ммоль) в сухом DMF (4,8 мл) обрабатывали с помощью Cs_2CO_3 (788 мг, 2,42 ммоль), перемешивали в течение 5 мин. и по каплям обрабатывали с помощью 1-бром-2-хлор($^2H_4$)этана (270 мкл, 3,16 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч. и затем при 70°C в течение 18 ч. После охлаждения смеси до 23°C все летучие вещества удаляли в вакууме. Остаток растворяли в CH_2Cl_2 (40 мл), промывали водой (2×13 мл), солевым раствором (13 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ (CH_2Cl_2/EtOAc 1:0 → 10:1,5) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 3 (109 мг, 49%) в виде белого рыхлого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,84 (с, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,47 ppm (с, 1H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): δ 160,19, 152,52, 151,54, 147,93, 146,06, 120,10, 113,72, 110,83 ppm (два углерода, направленных в область сильного поля, не наблюдаются). МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_4D_4ClN_2O_2^+$, 227,0520; обнаружено 227,0516.

***N*-(3-Хлор-2-фторфенил)(7,7,8,8-$^2H_4$)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK036).**



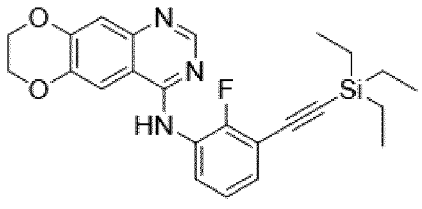
После общей процедуры А соединение JGK036 получали из 4-хлорхиназолина 3 (55 мг, 0,24 ммоль) и 3-хлор-2-фторанилина (52 мкл, 0,47 ммоль) в *i*PrOH (1,2 мл). JGK036•HCl выделяли фильтрацией из неочищенной реакционной смеси, и после подщелачивания и экстракции получали чистый JGK036 (67 мг, 82%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,62 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,53-7,43 (м, 2H), 7,27 (тд, *J*=8,1, 1,3 Гц, 1H), 7,19 ppm (с, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d_6): δ 157,17, 153,10, 152,45 (д, *J*=249,2 Гц), 149,28, 146,04, 143,68, 128,21 (д, *J*=12,0 Гц), 127,27, 127,03, 124,87 (д, *J*=4,7 Гц), 120,11 (д, *J*=16,7 Гц), 112,48, 109,64, 108,35, 63,50 (м, 2C’с). МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_8D_4ClFN_3O_2^+$, 336,0848; обнаружено 336,0841.

***N*-(3-Бром-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK037).**



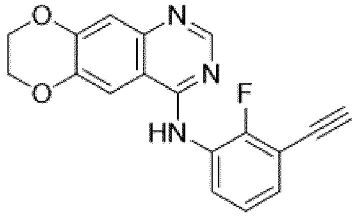
После общей процедуры А соединение JGK037 получали из 4-хлорхиназолина 1 (100 мг, 0,45 ммоль) и 3-бром-2-фторанилина (100 мкл, 0,89 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ (CH_2Cl_2/EtOAc 10:0 → 10:3) обеспечивала получение JGK037 (150 мг, 89%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд, *J*=8,3, 7,4, 1,5 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,35 (шир., 1H), 7,29 (с, 1H), 7,29-7,24 (м, 1H), 7,11 (тд, *J*=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,44-4,38 ppm (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 155,89, 153,37, 150,15 (д, *J*=242,2 Гц), 149,70, 146,75, 144,53, 128,65 (д, *J*=10,5 Гц), 127,24, 125,31 (д, *J*=4,7 Гц), 121,79, 114,53, 110,59, 108,59 (д, *J*=19,4 Гц), 105,93, 64,70, 64,51 ppm. МСВР (DART): *m*/*z* $[M - H]^-$ рассч. для $C_{16}H_{10}BrFN_3O_2^-$, 373,9946; обнаружено 373,9946.

***N*-{2-Фтор-3-[(триэтилсилил)этинил]фенил}-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (4).**



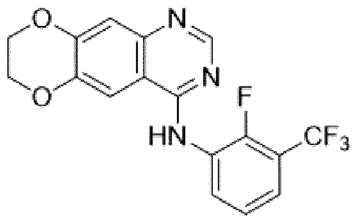
Во флакон объемом 1 драм загружали JGK010 (75 мг, 0,23 ммоль), XPhos (19,7 мг, 0,041 ммоль), Cs_2CO_3 (195 мг, 0,60 ммоль), $[PdCl_2•(MeCN)_2]$ (3,6 мг, 0,014 ммоль). Сосуд вакуумировали и снова заполняли аргоном (повторяется по меньшей мере два раза). Сухой ацетонитрил (1 мл) добавляли и оранжевую суспензию перемешивали при 23°C в течение 25 мин., затем вводили этинилтриэтилсилан (150 мкл, 0,84 ммоль). Пробирку герметизировали и реакционную смесь перемешивали при 95°C в предварительно нагретой масляной бане в течение 3,5 ч. Суспензии позволяли достичь 23°C, разбавляли с помощью EtOAc, фильтровали через слой SiO_2 (промывки с помощью EtOAc) и выпаривали. Очистка посредством ФХ (SiO_2; гексаны/EtOAc 8:2 → 4:6) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 4 (48 мг, 49%) в виде желтого пенистого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,681 (тд, *J*=8,1, 1,9 Гц, 1H), 8,678 (с, 1H), 7,382 (с, 1H), 7,376 (шир., 1H), 7,28 (с, 1H), 7,21-7,12 (м, 2H), 4,44-4,38 (м, 4H), 1,07 (т, *J*=7,9 Гц, 9H), 0,71 ppm (к, *J*=7,9 Гц, 6H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 155,95, 153,81 (д, *J*=248,0 Гц), 153,44, 149,62, 146,66, 144,47, 127,68, 127,60, 124,15 (д, *J*=4,5 Гц), 122,79, 114,49, 111,77 (д, *J*=14,6 Гц), 110,61, 105,97, 98,65, 98,49 (д, *J*=3,7 Гц), 64,70, 64,51, 7,63, 4,50 ppm. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{24}H_{27}N_3O_2Si^+$, 436,1851; обнаружено 436,1831.

***N*-(3-Этинил-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK038).**



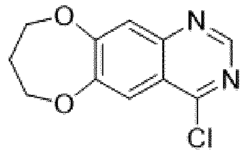
Смесь соединения 4 (40 мг, 0,09 ммоль) в мокром ТГФ (0,9 мл) по каплям обрабатывали с помощью 1 М раствора TBAF в ТГФ (450 мкл, 0,45 ммоль) и смесь перемешивали при 23°C в течение 18 ч. Воду (10 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×15 мл). Объединенные органические вещества промывали солевым раствором (20 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ (SiO_2; гексаны/EtOAc 7:3 → 3:7) с последующей второй ФХ (SiO_2; CH_2Cl_2/EtOAc 1:0 → 6:4) обеспечивала получение JGK038 (19 мг, 64%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,69 (тд, J=8,0, 1,8 Гц, 1H), 8,67 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,36 (шир., 1H), 7,29 (с, 1H), 7,24-7,15 (м, 2H), 4,43-4,38 (м, 4H), 3,34 ppm (с, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 155,94, 154,04 (д, *J*=248,8 Гц), 153,39, 149,65, 146,70, 144,47, 127,81, 127,68 (д, *J*=9,1 Гц), 124,30 (д, *J*=4,7 Гц), 123,47, 114,49, 110,58, 110,50 (д, *J*=14,3 Гц), 105,99, 82,95 (д, *J*=3,5 Гц), 76,70 (д, *J*=1,6 Гц), 64,69, 64,50 ppm. МСВР (DART): *m/z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{13}FN_3O_2^+$, 322,0986; обнаружено 322,0981.

***N*-[2-Фтор-3-(трифторметил)фенил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK039).**



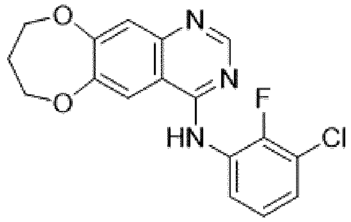
После общей процедуры А соединение JGK039 получали из 4-хлорхиназолина 1 (37 мг, 0,17 ммоль) и 2-фтор-3-(трифторметил)анилина (42 мкл, 0,33 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ (CH_2Cl_2/EtOAc 1:0 → 10:3) обеспечивала получение JGK039 (35 мг, 58%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 9,00-8,92 (м, 1H), 8,70 (с, 1H), 7,42 (шир., 1H), 7,40 (с, 1H), 7,35-7,28 (м, 2H), 7,30 (с, 1H), 4,46-4,38 ppm (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 155,77, 153,24, 150,27 (д, *J*=252,0 Гц), 149,81, 146,80, 144,66, 128,62 (д, *J*=8,5 Гц), 126,34, 124,44, 124,40, 122,66 (к, *J*=272,4 Гц), 120,41 (к, *J*=4,6 Гц), 114,58, 110,55, 105,86, 64,70, 64,51 ppm. МСВР (DART): *m/z* $[M - H]^-$ рассч. для $C_{17}H_{10}F_4N_3O_2^-$, 364,0715; обнаружено 364,0712.

4-Хлор-8,9-дигидро-7*H*-[1,4]диоксепино[2,3-*g*]хиназолин (5).



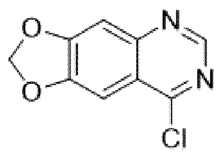
Раствор соединения 2 (100 мг, 0,51 ммоль) в сухом DMF (10 мл) обрабатывали с помощью Cs_2CO_3 (460 мг, 1,41 ммоль), перемешивали в течение 15 мин. и по каплям обрабатывали с помощью 1,3-дибромпропана (135 мкл, 1,33 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч. и затем при 65°C в течение 18 ч. После охлаждения до 23°C все летучие вещества удаляли в вакууме. Остаток суспендировали в CH_2Cl_2 (20 мл) и промывали водой (2×5 мл), высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ (гексаны/CH_2Cl_2 1:10 → 0:1 → CH_2Cl_2/EtOAc 10:1,5) с последующей другой ФХ (гексаны/EtOAc 10:1 → 10:3) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 5 (41 мг, 34%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,87 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,55 (с, 1H), 4,46 (т, J=5,8 Гц, 2H), 4,40 (т, J=6,0 Гц, 2H), 2,34 ppm (quint, J=5,9 Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 160,57, 158,86, 153,10, 153,03, 148,88, 120,83, 118,19, 115,64, 70,51, 70,33, 30,51 ppm. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{11}H_{10}ClN_2O_2^+$, 237,0425; обнаружено 237,0416.

***N*-(3-Хлор-2-фторфенил)-8,9-дигидро-7*H*-[1,4]диоксепино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK040).**



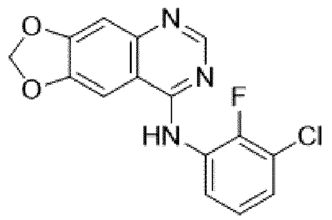
После общей процедуры A соединение JGK040 получали из 4-хлорхиназолина 5 (33 мг, 0,14 ммоль) и 3-хлор-2-фторанилина (32 мкл, 0,29 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ (CH_2Cl_2/EtOAc 1:0 → 10:3,5) обеспечивала получение JGK040 (34 мг, 70%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,72 (с, 1H), 8,39 (с, 1H), 8,08 (с, 1H), 7,53-7,45 (м, 2H), 7,29 (с, 1H), 7,27 (тд, J=8,1, 1,3 Гц, 1H), 4,32 (т, J=5,5 Гц, 2H), 4,29 (т, J=5,6 Гц, 2H), 2,22 ppm (quint, J=5,6 Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d_6): δ 157,43, 156,67, 153,85, 152,48 (д, J=249,3 Гц), 150,74, 147,29, 128,05 (д, J=12,0 Гц), 127,41, 127,04, 124,91 (д, J=4,7 Гц), 120,13 (д, J=16,5 Гц), 117,52, 113,81, 110,77, 70,75, 70,62, 30,80 ppm. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{17}H_{14}ClFN_3O_2^+$, 346,0753; обнаружено 346,0740.

8-Хлор-2*H*-[1,3]диоксоло[4,5-*g*]хиназолин (6).



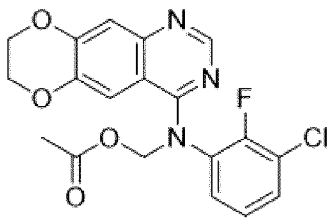
Раствор соединения 2 (100 мг, 0,51 ммоль) в сухом DMF (3,4 мл) обрабатывали с помощью Cs_2CO_3 (335 мг, 1,03 ммоль) и перемешивали при 23°C в течение 15 мин. Смесь по каплям обрабатывали с помощью хлорйодметана (130 мкл, 1,79 ммоль), перемешивали в течение 1 ч. и затем при 70°C в течение 17 ч. После охлаждения смеси до 23°C все летучие вещества удаляли в вакууме. Остаток суспендировали в CH_2Cl_2 (30 мл), промывали водой (2×7 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ (гексаны/CH_2Cl_2 3:10 → 0:1 → CH_2Cl_2/EtOAc 10:2) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 6 (38 мг, 36%) в виде белого рыхлого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,85 (с, 1H), 7,49 (с, 1H), 7,32 (с, 1H), 6,21 ppm (с, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 159,82, 154,89, 152,79, 150,94, 149,78, 121,23, 105,23, 102,89, 101,12 ppm. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_9H_6ClN_2O_2^+$, 209,0112; обнаружено 209,0104.

***N*-(3-Хлор-2-фторфенил)-2*H*-[1,3]диоксоло[4,5-*g*]хиназолин-8-амин (JGK041).**



После общей процедуры А соединение JGK041 получали из 4-хлорхиназолина 6 (35 мг, 0,17 ммоль) и 3-хлор-2-фторанилина (38 мкл, 0,35 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ (CH_2Cl_2/EtOAc 1:0 → 1:1) обеспечивала получение JGK041 (35 мг, 66%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d$_6$): δ 9,53 (с, 1H), 8,37 (с, 1H), 7,84 (с, 1H), 7,53-7,44 (м, 2H), 7,27 (тд, *J*=8,1, 1,3 Гц, 1H), 7,20 (с, 1H), 6,25 ppm (с, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*$_6$): δ 157,37, 153,10, 152,60, 152,43 (д, *J*=248,9 Гц), 148,56, 147,28, 128,30 (д, *J*=11,9 Гц), 127,17, 126,90, 124,88 (д, *J*=4,8 Гц), 120,12 (д, *J*=16,4 Гц), 109,82, 104,59, 102,38, 98,77 ppm. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{15}H_{10}ClFN_3O_2^+$, 318,0440; обнаружено 318,0435.

[(3-Хлор-2-фторфенил)(7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-ил)амино]метилацетат (JGK043).

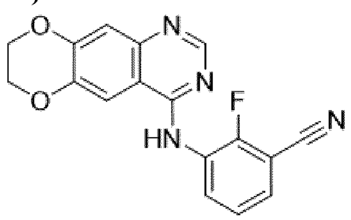


Смесь JGK010 (50 мг, 0,15 ммоль) в сухом ТГФ (0,5 мл) по каплям обрабатывали с помощью 1 М раствора LiHMDS в ТГФ (150 мкл, 0,15 ммоль) при 0°C. После перемешивания в течение 15 мин. при этой температуре смесь добавляли по каплям в раствор хлорметилацетата (55 мкл, 0,57 ммоль) в сухом ТГФ (0,5 мл). Колбу, которая изначально содержала раствор JGK010, промывали с помощью 0,5 мл сухого ТГФ и добавляли в реакционную смесь. После перемешивания при 0°C в течение 2 ч. перемешивание продолжали при 23°C в течение 22 ч. Насыщ. водн. раствор $NaHCO_3$ (10 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×10 мл). Объединенные органические вещества сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали в вакууме. Очистка посредством ФХ (CH_2Cl_2/EtOAc 1:0 -> 1:1) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения JGK043 (30 мг, 49%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 7,93 (с, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,08-6,97 (м, 2H), 6,94 (тд, *J*=7,2, 2,1 Гц, 1H), 6,82 (с, 1H), 5,73 (с, 2H), 4,40-4,29 (м, 4H), 2,12 ppm (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 170,33, 152,96, 150,10 (д, *J*=245,6 Гц), 149,37, 148,05, 143,24, 140,17 (д, *J*=13,1 Гц), 131,89, 124,17, 124,12 (д, *J*=4,8 Гц), 122,59 (д, *J*=2,4 Гц), 121,33 (д, *J*=17,1 Гц), 115,41, 114,31, 102,24, 71,19, 65,07, 64,23, 20,85 ppm. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{19}H_{16}ClFN_3O_4^+$, 404,0808; обнаружено 404,0792.

Пример 3: Получение дополнительных иллюстративных соединений серии JGK

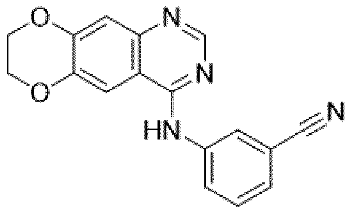
Общие процедуры. Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Реакции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора CEM Discover. Реакции при комнатной температуре (к. т.) проводили при температуре окружающей среды (приблизительно 23°C). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60 F_{254} с пятнами, визуализированными УФ-светом (λ=254, 365 нм) или с использованием щелочного раствора $KMnO_4$. Колоночную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на SiO_2 60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при 25-50°C. Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса (^{1}H ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода (^{13}C ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР (δ ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные ^{1}H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm; множественность (с=синглет, д=дублет, т=триплет, к=квартет, quint=квинтет, м=мультиплет/смешанный тип, тд=триплет дублетов, ддд=дублет дублетов дублетов, br=широкий сигнал); постоянные взаимодействия (J) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР ^{13}C представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействия. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART или на масс-спектрометре Waters LCT Premier с ACQUITY UPLC с автопробоотборником.

3-[(7,8-Дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-ил)амино]-2-фторбензонитрил (JGK044).



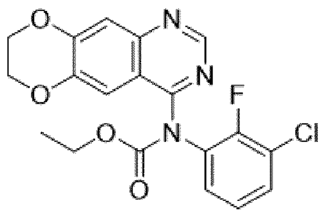
^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=9,06-8,98 (м, 1H), 8,69 (с, 1H), 7,41 (с, 1H), 7,39 (уш, 1H), 7,35-7,31 (м, 2H), 7,30 (с, 1H), 4,45-4,37 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,63, 153,63 (д, J=254,6 Гц), 153,04, 149,94, 146,80, 144,76, 128,60 (д, J=7,8 Гц), 127,48, 126,58, 125,31 (д, J=4,5 Гц), 114,56, 113,80, 110,45, 105,83, 101,30 (д, J=13,9 Гц), 64,70, 64,51 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{17}H_{12}FN_4O_2^+$, 323,0939; обнаружено 323,0927.

3-[(7,8-Дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-ил)амино]бензонитрил (JGK045).



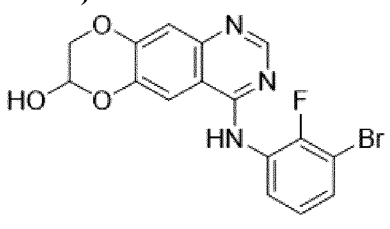
[1]H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,68 (с, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,46 (т, J=1,9 Гц, 1H), 8,18 (ддд, J=8,2, 2,3, 1,2 Гц, 1H), 8,08 (с, 1H), 7,58 (т, J=7,9 Гц, 1H), 7,53 (дт, J=7,6, 1,4 Гц, 1H), 7,22 (с, 1H), 4,49-4,36 м.д. (м, 4H). [13]C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=156,24, 152,69, 149,31, 146,15, 143,80, 140,52, 129,87, 126,35, 125,96, 124,15, 118,93, 112,66, 111,23, 109,96, 108,30, 64,52, 64,19 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{17}H_{13}N_4O_2^+$, 305,1033; обнаружено 305,1018.

Этил-(3-хлор-2-фторфенил)7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-илкарбамат (JGK047).



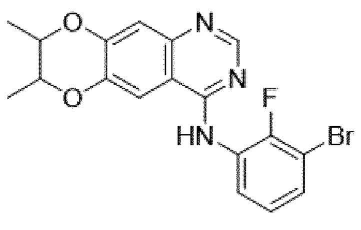
[1]H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,96 (с, 1H), 7,483 (с, 1H), 7,477 (с, 1H), 7,37 (дд, J=8,1, 6,7 Гц, 2H), 7,08 (тд, J=8,1, 1,5 Гц, 1H), 4,45-4,38 (м, 4H), 4,27 (q, J=7,1 Гц, 2H), 1,22 м.д. (т, J=7,1 Гц, 3H). [13]C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): 158,98, 154,43 (д, J=250,7 Гц), 153,90, 153,41, 151,17, 149,68, 145,61, 130,12, 129,85 (д, J=12,4 Гц), 128,20, 124,50 (д, J=5,1 Гц), 122,22 (д, J=16,8 Гц), 117,96, 113,51, 109,68 (д, J=2,0 Гц), 64,73, 64,36, 63,44, 14,43,м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{19}H_{16}ClFN_3O_4^+$, 404,0808; обнаружено 404,0800.

(±)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-7-ол ((±)-JGK050).



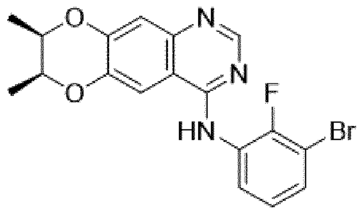
[1]H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,61 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,72 (д, J=5,4 Гц, 1H), 7,60 (т, J=7,1 Гц, 1H), 7,55 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,21 (т, J=8,2 Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 5,70-5,59 (м, 1H), 4,27 (д, J=11,0 Гц, 1H), 4,17 м.д. (д, J=10,6 Гц, 1H). [13]C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=157,18, 153,38 (д, J=247,4 Гц), 153,13, 148,78, 146,14, 141,92, 130,12, 128,05 (д, J=13,8 Гц), 127,78, 125,45 (д, J=4,4 Гц), 111,95, 109,87, 108,71, 108,55 (д, J=20,3 Гц), 88,63, 67,23 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{12}BrFN_3O_3^+$, 392,0041; обнаружено 392,0030.

Диастереомерная смесь (±)-*цис*- и (±)-*транс*-*N*-(3-бром-2-фторфенил)-7,8-диметил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амина ((±)-*цис*/*транс*-JGK051).



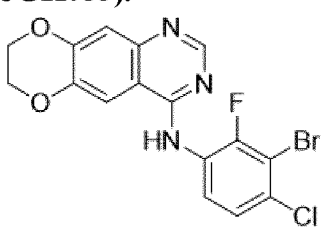
[1]H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$; (±)-*цис*/*транс* 2:1): δ=8,68 (с, 1H), 8,68-8,63 (м, 1H), 7,37 (с, 1H), 7,35 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,28-7,24 (м, 1H), 7,10 (тд, *J*=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,52-4,39 (м, 1,3H), 4,09-3,98 (м, 0,7H), 1,453 (д, *J*=6,1 Гц, 1,1H), 1,451 (д, *J*=6,1 Гц, 1,1H), 1,369 (д, *J*=6,6 Гц, 1,9H), 1,368 м.д. (д, *J*=6,6 Гц, 1,9H). [13]C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$; (±)-*цис*/*транс* 2:1): δ=155,87, 155,84, 153,19, 150,12 (д, *J*=242,5 Гц), 150,09 (д, *J*=242,2 Гц), 149,87, 148,89, 146,77, 144,64, 143,63, 128,73 (д, *J*=10,0 Гц), 127,15, 127,12, 125,31 (д, *J*=4,7 Гц), 121,71, 121,70, 114,30, 113,93, 110,54, 110,47, 108,57 (д, *J*=19,4 Гц), 105,66, 105,28 м.д. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{16}BrFN_3O_2^+$, 404,0404; обнаружено 404,0393.

(±)-*цис*-*N*-(3-Бром-2-фторфенил)-7,8-диметил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин ((±)-JGK052).



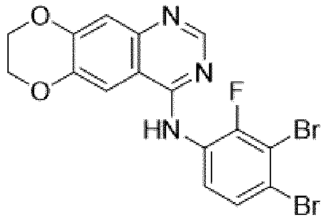
[1]H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,66 (ддд, *J*=8,6, 7,4, 1,6 Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,35 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,30-7,23 (м, 1H), 7,10 (тд, *J*=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,50-4,41 (м, 2H), 1,369 (д, *J*=6,6 Гц, 3H), 1,368 м.д. (д, *J*=6,5 Гц, 3H). [13]C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,85, 153,19, 150,11 (д, *J*=242,1 Гц), 148,89, 146,77, 143,63, 128,73 (д, *J*=10,2 Гц), 127,14, 125,31 (д, *J*=4,7 Гц), 121,71, 114,30, 110,54, 108,57 (д, *J*=19,5 Гц), 105,65, 72,85, 72,58, 14,71, 14,55 м.д. МСВР (ИЭР): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{16}BrFN_3O_2^+$, 404,0404; обнаружено 404,0416.

***N*-(3-Бром-4-хлор-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK053).**



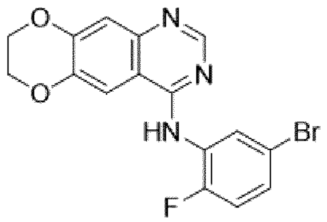
[1]H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,70 (с, 1H), 8,35 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,61 (дд, *J*=8,8, 7,7 Гц, 1H), 7,55 (дд, *J*=8,7, 1,5 Гц, 1H), 7,20 (с, 1H), 4,47-4,35 м.д. (м, 4H). [13]C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=157,03, 154,14 (д, *J*=249,5 Гц), 153,01, 149,36, 146,08, 143,74, 130,75, 127,77 (д, *J*=2,9 Гц), 126,80 (д, *J*=13,4 Гц), 125,37 (д, *J*=3,8 Гц), 112,50, 110,15 (д, *J*=22,5 Гц), 109,66, 108,39, 64,51, 64,14 м.д. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}BrClFN_3O_2^+$, 409,9702; обнаружено 409,9697.

N-(3,4-Дибром-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK054).



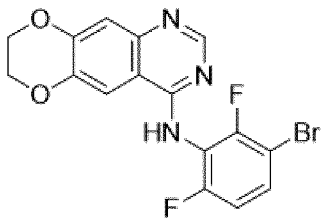
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,65 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,92 (с, 1H), 7,67 (д, J=8,7 Гц, 1H), 7,55 (т, J=8,2 Гц, 1H), 7,20 (с, 1H), 4,45-4,35 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=156,95, 153,98 (д, J=249,1 Гц), 152,99, 149,35, 146,09, 143,74, 128,50 (д, J=3,7 Гц), 128,14, 127,21 (д, J=13,7 Гц), 120,96, 112,51, 112,33, 109,68, 108,36, 64,51, 64,14 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}Br_2FN_3O_2^+$, 453,9197; обнаружено 453,9191.

N-(5-Бром-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK055).



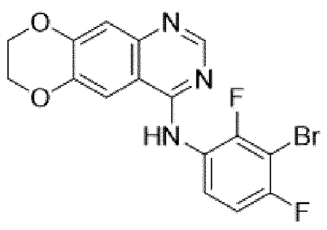
^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,99 (дд, J=7,3, 2,5 Гц, 1H), 8,72 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,36 (уш, 1H), 7,27 (с, 1H), 7,16 (ддд, J=8,7, 4,6, 2,5 Гц, 1H), 7,04 (дд, J=10,9, 8,7 Гц, 1H), 4,44-4,36 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,59, 153,35, 152,16 (д, J=243,1 Гц), 149,69, 146,67, 144,52, 128,75 (д, J=10,5 Гц), 126,16 (д, J=7,6 Гц), 125,06, 117,19 (д, J=3,4 Гц), 116,20 (д, J=20,9 Гц), 114,52, 110,48, 105,85, 64,68, 64,50 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{12}BrFN_3O_2^+$, 376,0091; обнаружено 376,0077.

N-(3-Бром-2,6-дифторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK056).



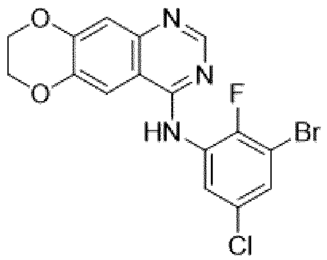
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,60 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,74 (тд, J=8,1, 5,5 Гц, 1H), 7,28 (т, J=9,3 Гц, 1H), 7,21 (с, 1H), 4,44-4,38 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=157,78 (дд, J=248,8, 3,3 Гц), 157,37, 155,01 (дд, J=247,9, 4,9 Гц), 153,08, 149,47, 146,04, 143,86, 130,76 (д, J=9,3 Гц), 117,30 (т, J=17,5 Гц), 113,30 (дд, J=21,8, 3,0 Гц), 112,56, 109,45, 108,28, 103,55 (дд, J=20,4, 3,6 Гц), 64,52, 64,14 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}BrF_2N_3O_2^+$, 393,9997; обнаружено 394,0008.

N-(3-Бром-2,4-дифторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK057).



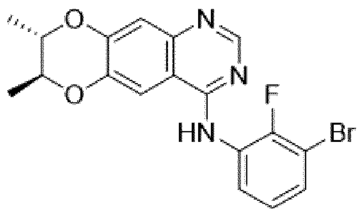
[1]H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,64 (с, 1H), 8,51 (тд, J=9,0, 5,6 Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,29 (с, 1H), 7,23 (уш, 1H), 7,04 (ддд, J=9,2, 7,8, 2,1 Гц, 1H), 4,45-4,37 м.д. (м, 4H). [13]C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=156,10, 155,80 (дд, J=246,6, 3,5 Гц), 153,28, 151,25 (дд, J=245,1, 4,0 Гц), 149,74, 146,56, 144,53, 124,39 (дд, J=10,8, 3,4 Гц), 122,72 (дд, J=8,3, 1,8 Гц), 114,42, 111,49 (дд, J=22,5, 3,9 Гц), 110,34, 105,98, 97,86 (дд, J=25,7, 22,9 Гц), 64,69, 64,50 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}BrF_2N_3O_2^+$, 393,9997; обнаружено 394,0013.

***N*-(3-Бром-5-хлор-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK058).**



[1]H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,88 (дд, J=6,6, 2,6 Гц, 1H), 8,73 (с, 1H), 7,41 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,26 (с, 1H), 7,28-7,23 (м, 1H), 4,44-4,39 м.д. (м, 4H). [13]C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,45, 153,13, 149,88, 148,60 (д, J=241,7 Гц), 146,76, 144,72, 130,30 (д, J=4,4 Гц), 129,26 (д, J=10,8 Гц), 126,08, 121,21, 114,60, 110,49, 108,68 (д, J=20,9 Гц), 105,71, 64,70, 64,52 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}BrClFN_3O_2^+$, 409,9702; обнаружено 409,9713.

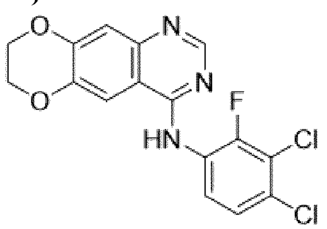
(±)-*транс*-*N*-(3-Бром-2-фторфенил)-7,8-диметил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин ((±)-JGK059).



[1]H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,66 (ддд, J=8,6, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,376 (с, 1H), 7,375 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,28-7,24 (м, 1H), 7,10 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,08-3,98 (м, 2H), 1,451 (д, J=6,1 Гц, 3H), 1,448 м.д. (д, J=6,1 Гц, 3H). [13]C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,90, 153,12, 150,12 (д, J=242,5 Гц), 149,90, 146,59, 144,65, 128,70 (д, J=10,2 Гц), 127,18, 125,30 (д, J=4,5 Гц), 121,74, 113,84, 110,43, 108,57 (д, J=19,2 Гц), 105,31, 75,31, 75,05, 17,23, 17,20 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{16}BrFN_3O_2^+$, 404,0404; обнаружено 404,0405.

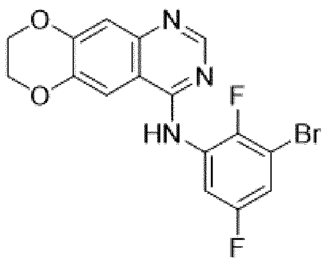
***N*-(3,4-Дихлор-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин**

(JGK060).



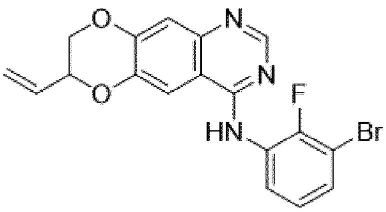
^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,67 (с, 1H), 8,59 (т, J=8,6 Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,38 (уш, 1H), 7,33 (дд, J=9,1, 2,1 Гц, 1H), 7,31 (с, 1H), 4,45-4,38 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,84, 153,08, 149,98 (д, J=246,3 Гц), 149,88, 146,42, 144,67, 127,55, 127,19 (д, J=10,0 Гц), 125,30 (д, J=4,1 Гц), 121,05, 120,47 (д, J=18,2 Гц), 114,36, 110,43, 105,97, 64,71, 64,51 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}Cl_2FN_3O_2^+$, 366,0207; обнаружено 366,0207.

***N*-(3-Бром-2,5-дифторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK061).**



^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,65 (с, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,63-7,54 (м, 2H), 7,21 (с, 1H), 4,45-4,37 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=157,29 (д, J=243,5 Гц), 156,84, 152,93, 149,97 (д, J=242,9 Гц), 149,43, 146,16, 143,81, 129,22-128,44 (m), 116,30 (д, J=26,7 Гц), 113,99 (д, J=25,7 Гц), 112,53, 109,73, 108,76 (дд, J=22,5, 12,5 Гц), 108,33, 64,52, 64,15 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}BrF_2N_3O_2^+$, 393,9997; обнаружено 393,9988.

(±)-*N*-(3-Бром-2-фторфенил)-7-этенил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин ((±)-JGK062).



^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд, J=8,2, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,27 (ддд, J=8,0, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,10 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 5,95 (ддд, J=17,3, 10,7, 5,8 Гц, 1H), 5,60 (дт, J=17,3, 1,2 Гц, 1H), 5,48 (дт, J=10,7, 1,1 Гц, 1H), 4,82-4,74 (м, 1H), 4,42 (дд, J=11,5, 2,5 Гц, 1H), 4,09 м.д. (дд, J=11,6, 8,1 Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,90, 153,38, 150,14 (д, J=242,4 Гц), 149,12, 146,70, 144,12, 131,48, 128,64 (д, J=10,3 Гц), 127,24, 125,30 (д, J=4,7 Гц), 121,76, 120,43, 114,29, 110,69, 108,58 (д, J=19,3 Гц), 106,06, 74,03, 67,84 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{14}BrFN_3O_2^+$, 402,0248; обнаружено 402,0233.

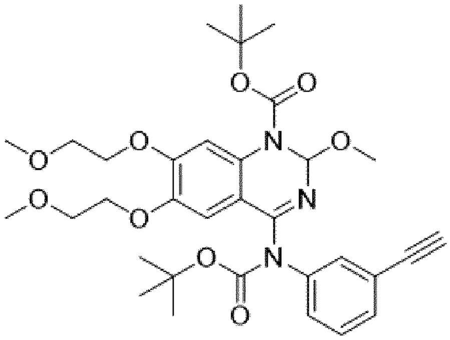
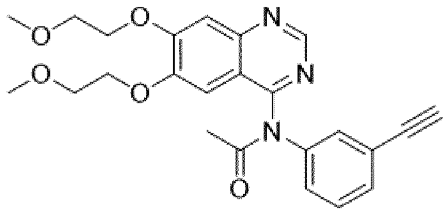
Пример 4: Биоактивность и протокол анализа иллюстративных соединений

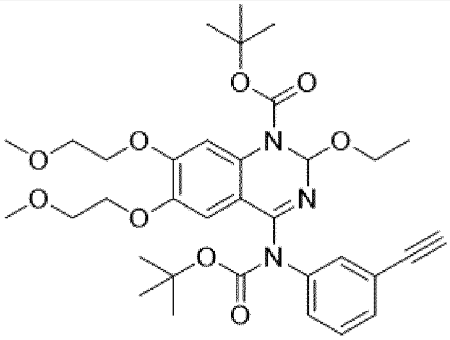
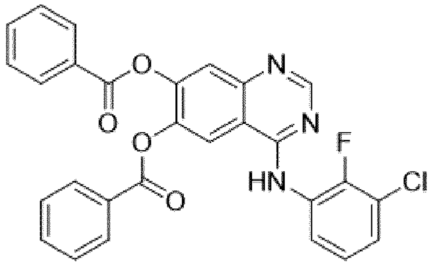
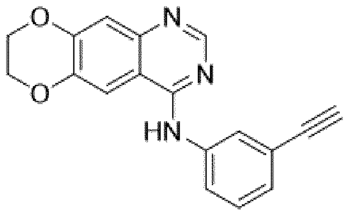
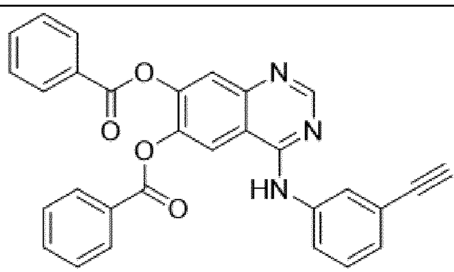
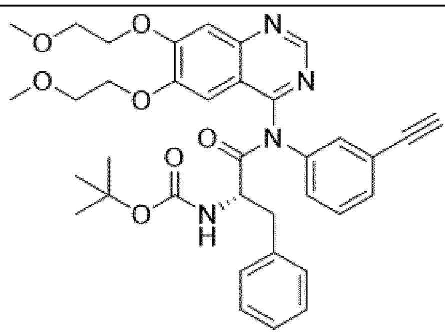
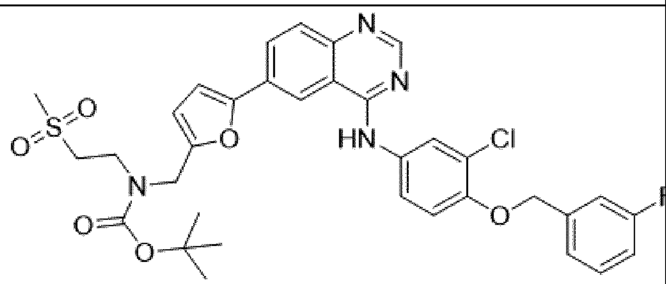
Анализ бесклеточной киназы EGFR выполняли с использованием системы киназ EGFR (Promega # V3831). 13 концентраций при 2-кратных разведениях от 250 нМ до 0,03052 нМ, без контроля лекарственного средства и без ферментного контроля использовали в дубликатах на 25 нг фермента EGFR на реакцию. Анализ киназы ADP-Glo (Promega # V6930) использовали для измерения активности EGFR в присутствии ингибиторов.

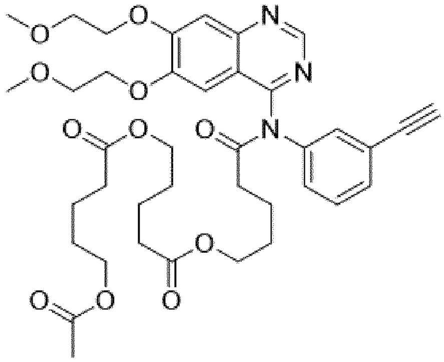
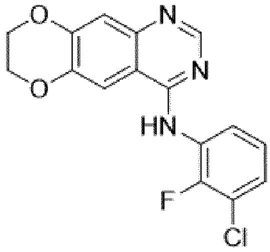
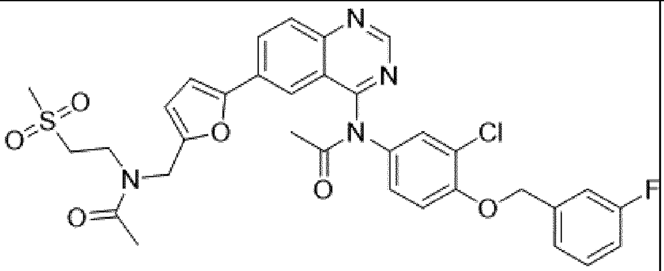
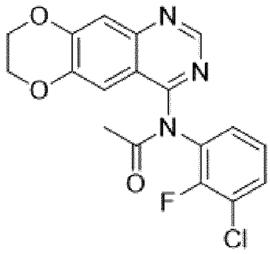
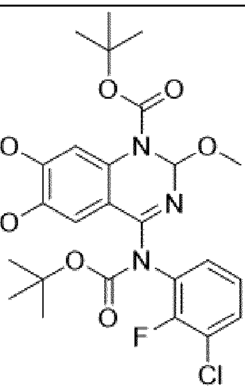
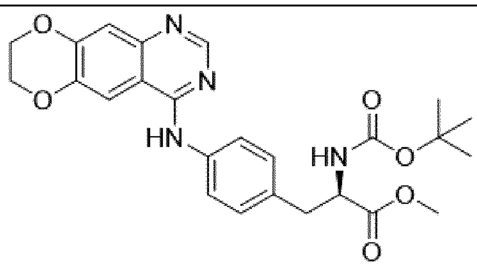
Анализы GI50 проводили с использованием полученных от пациента клеток глиобластомы. 13 концентраций при 2-кратных разведениях от 40000 нМ до 9,77 нМ (для линий GBM) или от 4000 нМ до 0,977 нМ (для линий рака легкого (HK031)) высевали на 384-луночные планшеты в четырех повторностях по 1500 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 3 дней, а затем пролиферацию оценивали с помощью Cell Titer Glo (Promega # G7570). В качестве эталона эрлотиниб характеризовался GI_{50} 642 нМ (HK301) и 2788 нМ (GBM39).

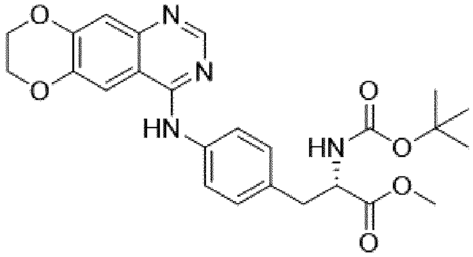
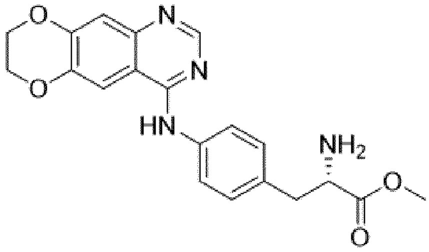
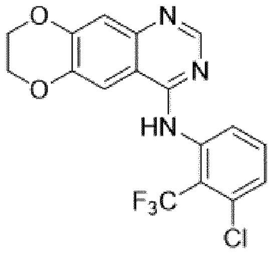
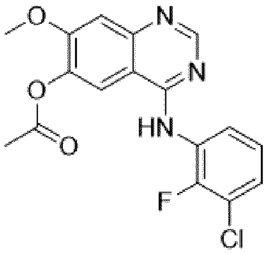
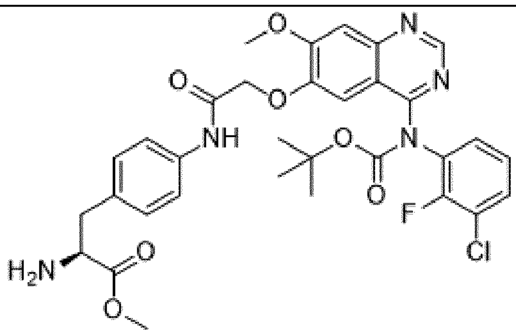
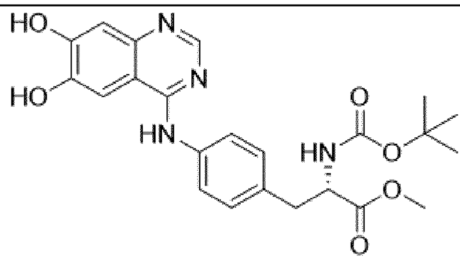
Фармакокинетические исследования проводили на самцах мышей CD-1 в возрасте 8-10 недель. Мышам вводили дозы, указанные в дубликатах. В определенные моменты времени получали цельную кровь путем ретроорбитального кровотечения и собирали ткань головного мозга. Образцы крови центрифугировали для получения плазмы крови, а ткань головного мозга промывали и гомогенизировали. Образцы экстрагировали ацетонитрилом и надосадочную жидкость сушили с помощью скоростного вакуума. Высушенные образцы растворяли в смеси ацетонитрил: вода: муравьиная кислота в соотношении 50: 50: 0,1 и количественно определяли на трехквадрупольной ЖХ/МС Agilent серии 6400.

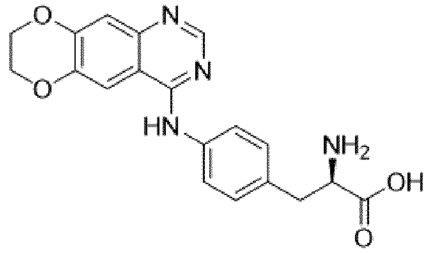
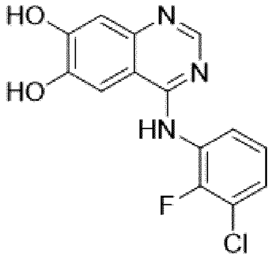
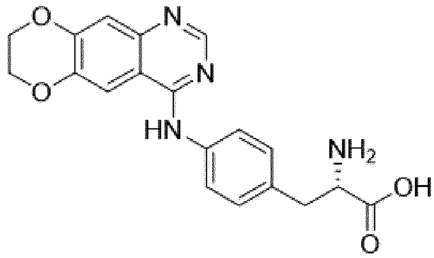
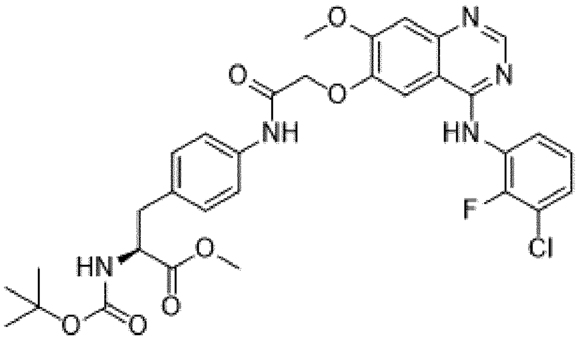
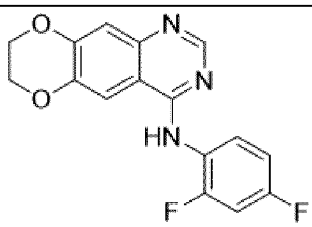
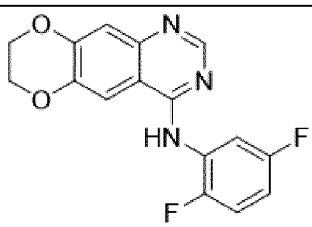
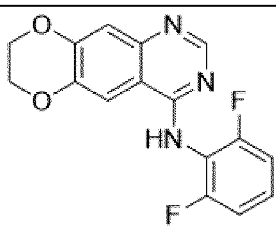
Таблица 3. Активность иллюстративных соединений

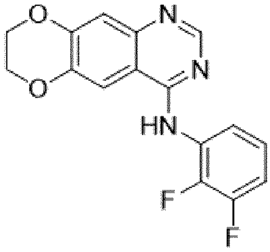
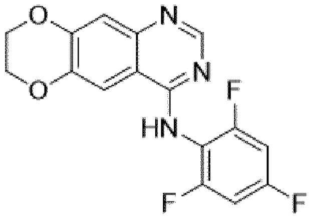
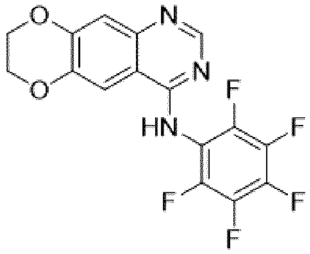
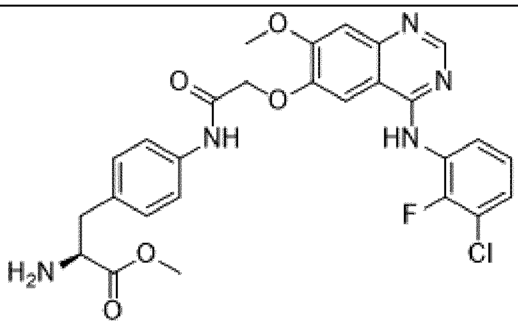
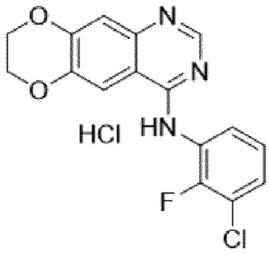
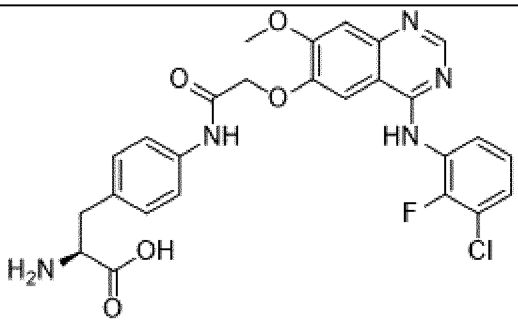
Номер	Структура	HK301 GI_{50} (нМ)	GBM39 GI_{50} (нМ)
JGK001		2214	19670
JGK002		5448	19820

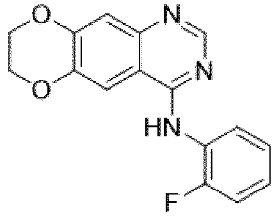
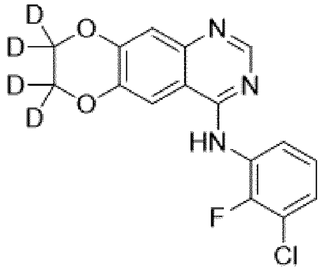
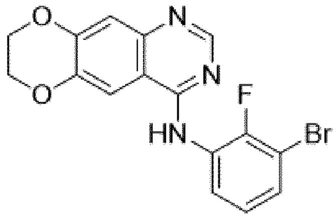
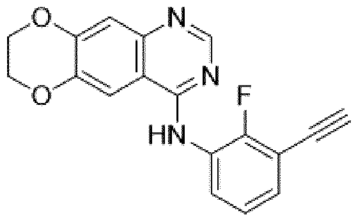
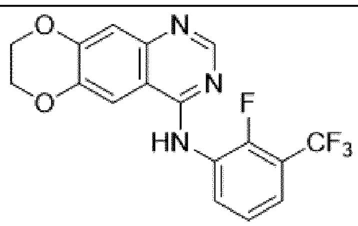
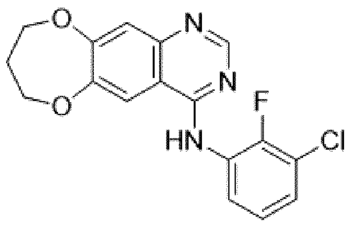
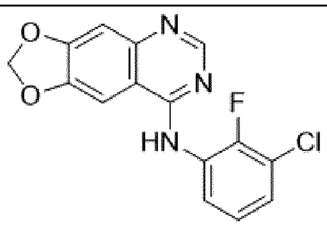
JGK003		1127	23110
JGK004		23383	102690
JGK005		8824	20536
JGK006		11012	51380
JGK007		92147	-
JGK008		81269	-

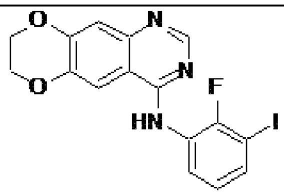
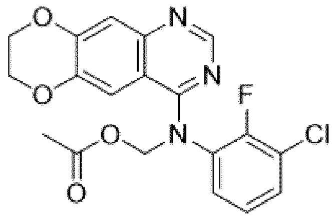
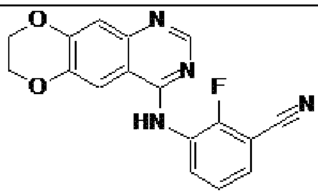
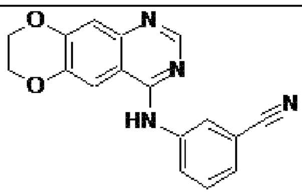
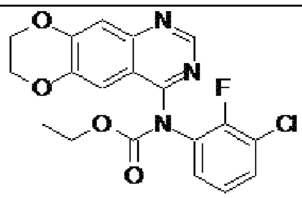
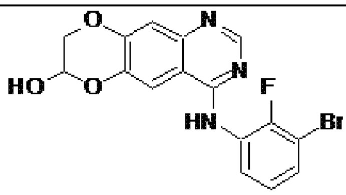
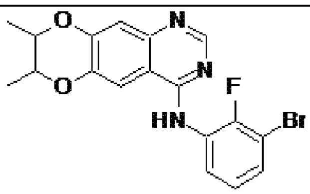
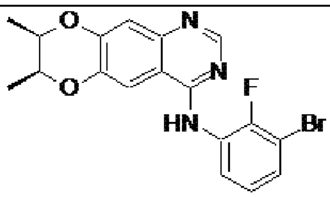
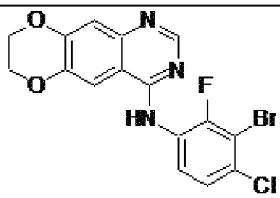
JGK009		6096	14640
JGK010		780,5	2594
JGK011		9206	3252
JGK001 2		5477	10820
JGK013		1551	219870
JGK014		11816	27914

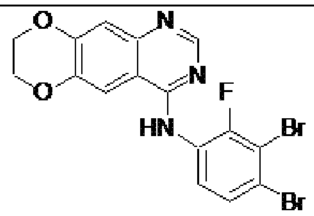
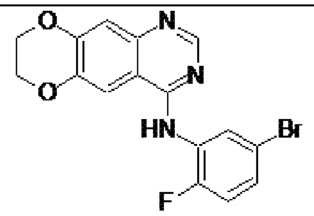
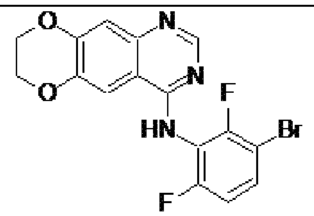
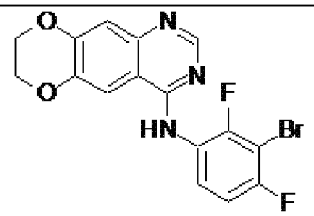
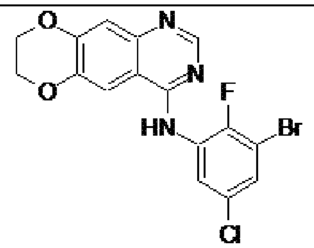
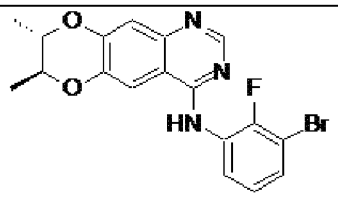
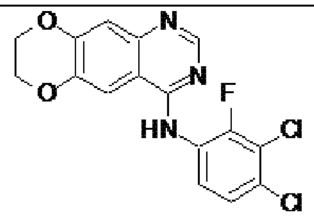
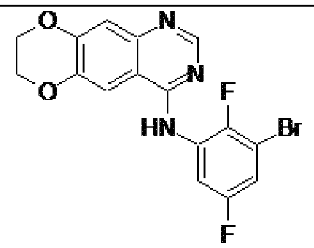
JGK015		2154	11540
JGK016		4052	61593
JGK017		64235	97624
JGK018		1071	4543
JGK019		-	-
JGK020		29236	36179

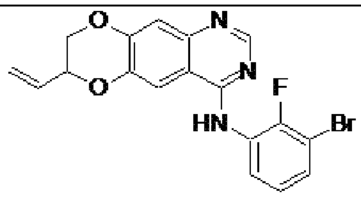
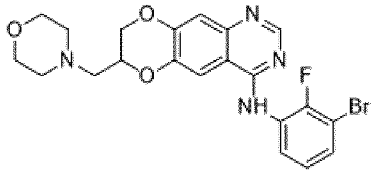
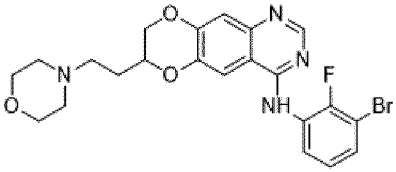
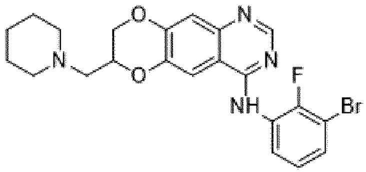
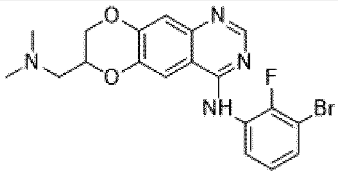
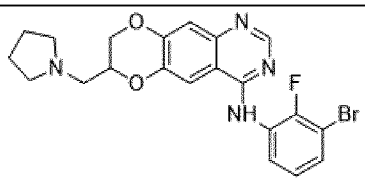
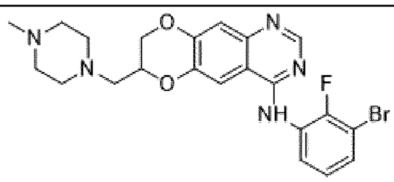
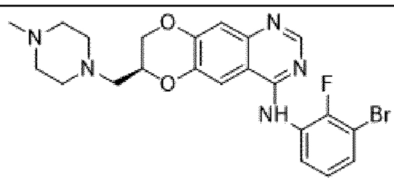
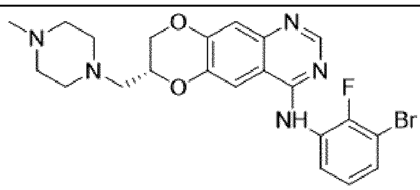
JGK021		480850	555780
JGK022		31116	150164
JGK023		86230	96260
JGK024		156370	124940
JGK025		10659	27706
JGK026		6124	16525
JGK027		5807	11837

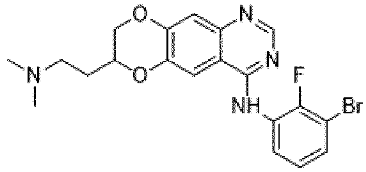
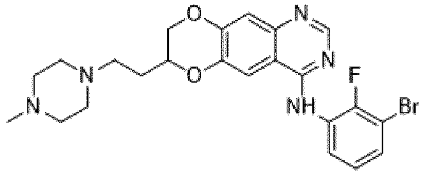
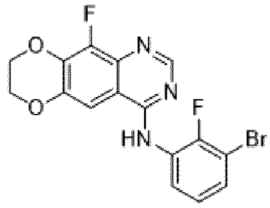
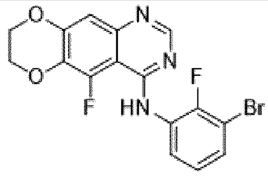
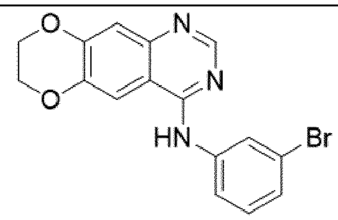
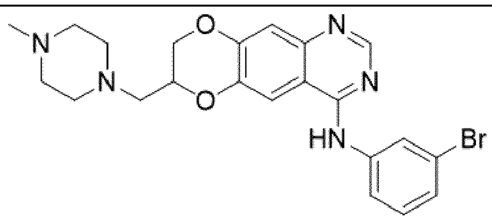
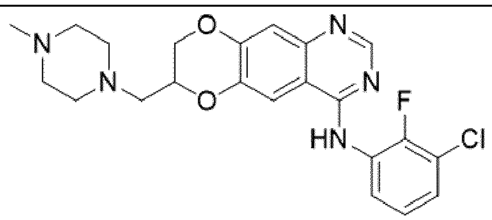
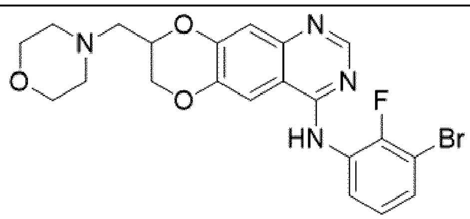
JGK028		1688	5572
JGK029		24395	33970
JGK030		558742	961204
JGK031		-	-
JGK032		780,5	2594
JGK033		-	-

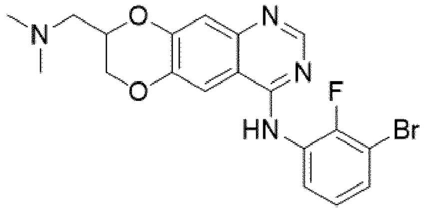
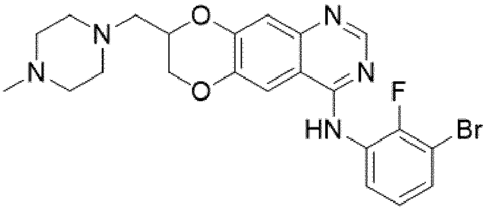
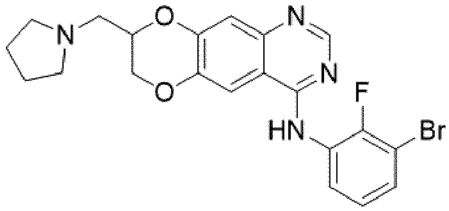
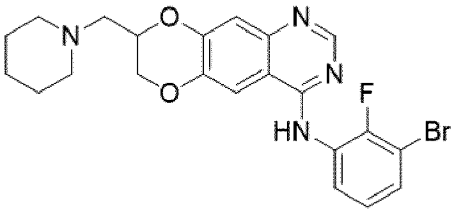
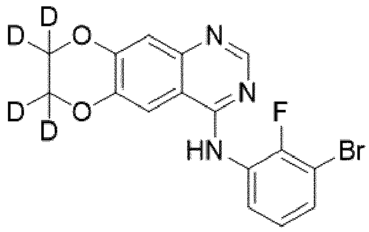
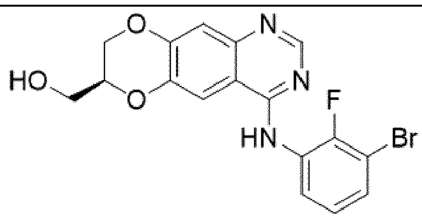
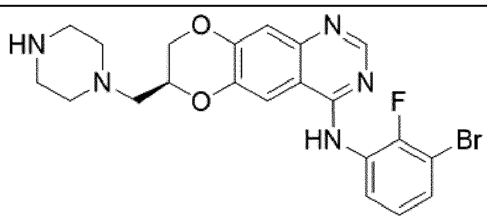
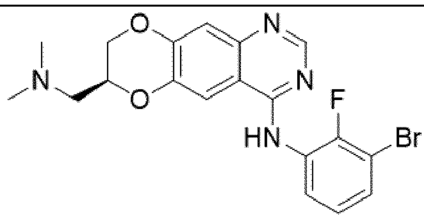
JGK035		4040	10721
JGK036		1046	4507
JGK037		329,3	1116
JGK038		791,1	2946
JGK039		3614	7820
JGK040		1721	7115
JGK041		1658	6042

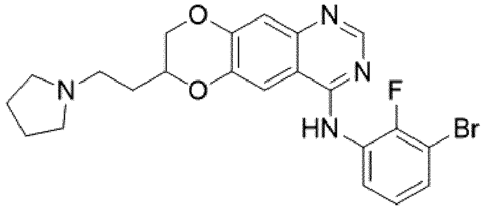
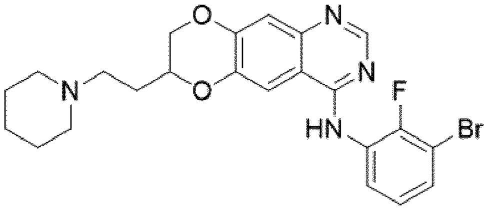
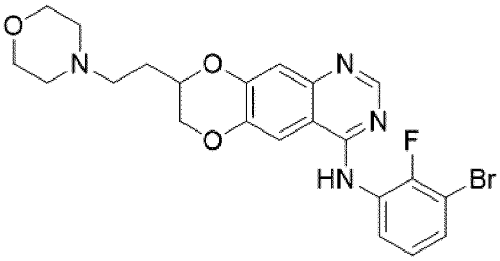
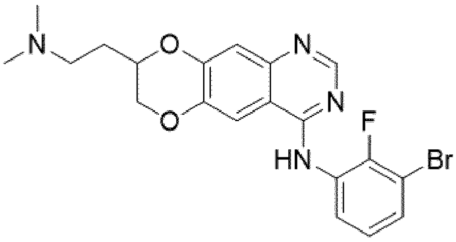
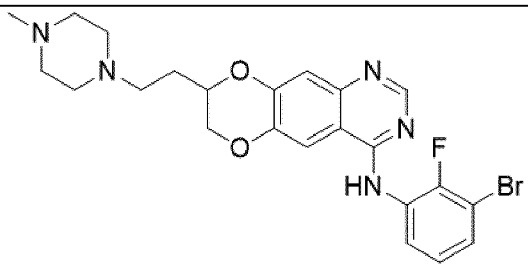
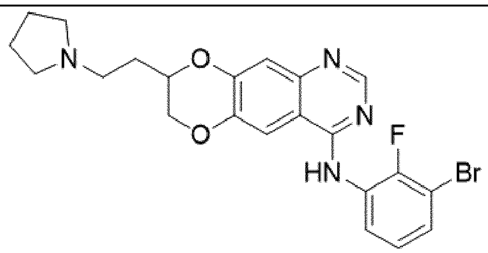
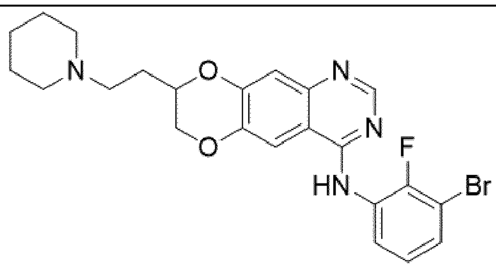
JGK042		2294	4521
JGK043		745	1778
JGK044		4522	5635
JGK045		3940	10939
JGK047		316000	-
JGK050		1159	3568
JGK051		8253	24140
JGK052		3866	9219
JGK053		2778	5277

JGK054		5723	7697
JGK055		290,1	966,4
JGK056		418,7	1355,8
JGK057		1382,7	9361,5
JGK058		1852,7	12974
JGK059		8110	11218
JGK060		2947	3501
JGK061		1131	1727

JGK062		3784	5856
JGK063		816	3431
JGK064		1213	4005
JGK065		3432	7339
JGK066		734	2395
JGK067		898	2198
JGK068		577	1613
JGK068 S		439,7	1212
JGK068 R		1396	3384

JGK069		659	2165
JGK070		1405	3333
JGK071		5749	10256
JGK072		5017	12033
JGK073		2055	6073
JGK074		2276	6670
JGK075		1181	4005
JGK076		6161	16944

JGK077		6844	16733
JGK078		2034	5758
JGK079		7214	15709
JGK080		7374	14528
JGK081		-	-
JGK082 S		1668	1892
JGK083 S		529	841
JGK066 S		301	2633

JGK084		1835	5638
JGK085		1015	2617
JGK086		2559	4453
JGK087		3741	5257
JGK088		2132	4061
JGK089		3162	5090
JGK090		2394	4330

Пример 5: Связывание белка эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению

Ниже в таблице 4 проиллюстрировано связывание белка эрлотиниба и нескольких иллюстративных соединений по изобретению. Fu относится к “несвязанной фракции”. Kpuu относится к «коэффициенту несвязанного распределения головного мозга и плазмы крови в состоянии равновесия».

Таблица 4. Связывание белка эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению

Соединение	**Fu (кровь)/Fu (головной мозг)**	**Связанное (кровь)/(головной мозг)**	**Kpuu (Avg)**
Эрлотиниб	4,88%	95,12%	0,0513
	2,93%	97,07%	
AZD3759	5,20%	94,80%	0,802
	1,44%	98,56%	
JGK005	1,35%	98,65%	0,491
	1,02%	98,98%	
JGK038	1,30%	98,70%	0,575
	0,89%	99,11%	
JGK028	1,44%	98,56%	1,037
	1,41%	98,59%	
JGK010	1,12%	98,88%	1,045
	1,10%	98,90%	
JGK037	1,70%	98,30%	1,301
	1,04%	98,96%	
JGK042	1,85%	98,15%	1,033
	1,14%	98,86%	
JGK063	8,04%	91,96%	0,341
	3,78%	96,22%	
JGK066	7,04%	92,96%	1,175
	3,02%	96,98%	
JGK068	6,31%	93,69%	1,184
	2,11%	97,89%	
JGK068S	5,96%	94,04%	1,181
	1,86%	98,14%	
JGK068R	5,33%	94,67%	1,046
	1,57%	98,43%	
JGK083S	7,02%	92,98%	0,798

	2,42%	97,58%	

Пример 6: Классификация пациентов с метаболической реакцией и без метаболической реакции на EGFRi

Были охарактеризованы изменения в потреблении глюкозы с острым ингибированием EGFR в 19 клеточных линиях GBM, полученных от пациентов. Клетки культивировали в бессывороточной среде с добавками в виде глиомасфер, которые, в отличие от условий культивирования на основе сыворотки, сохраняют многие молекулярные особенности опухолей пациентов. Обработка ингибитором тирозинкиназы EGFR (EGFRi) эрлотинибом выявила подмножество GBM, у которых поглощение радиоактивно меченой глюкозы (^{18}F-FDG) было значительно ослаблено ингибированием EGFR; в дальнейшем называемые «пациентами с метаболической реакцией» (фиг. 21A и фиг. 27A). Подавление *EGFR* с использованием миРНК подтвердило, что снижение поглощения глюкозы не было связано с нецелевыми эффектами эрлотиниба (фиг. 27B, 27C). Снижение поглощения ^{18}F-FDG клетками, обработанными EGFRi, было связано со снижением выработки лактата, потребления глюкозы и скорости внеклеточного закисления (ECAR), но уровни глутамина оставались неизменными (фиг. 21B и фиг. 27D-G). Наконец, снижение утилизации глюкозы коррелировало с нарушениями передачи сигналов RAS-MAPK и PI3K-AKT-mTOR, каждый из которых может регулировать метаболизм глюкозы при GBM и других видах рака (фиг. 28A).

Напротив, у всех «пациентов без метаболической реакции» с GBM (т.е. отсутствие изменений в поглощении ^{18}F-FDG с EGFRi или миРНК) (фиг. 21A и фиг. 27B, 27C) не наблюдалось изменений в потреблении глюкозы, выработке лактата и ECAR, несмотря на сильное ингибирование EGFR (фиг. 21B, фиг. 27D-G и фиг. 28B). Более того, передача сигналов RAS-MAPK и PI3K-AKT-mTOR в этих клетках в значительной степени не затрагивалась (фиг. 28B). Примечательно, что в то время как все пациенты с метаболической реакцией имели изменения в *EGFR* (увеличение числа копий, мутация), 6 линий GBM без метаболической реакции также содержали мутации *EGFR* и/или увеличение числа копий (фиг. 29A, 29B). Вместе эти данные иллюстрируют два ключевых момента. Во-первых, срочное ингибирование EGFR быстро снижает утилизацию глюкозы в подмножестве первичных клеток GBM, а во-вторых, генетические изменения в *EGFR* не могут сами по себе предсказать, какие GBM имеют метаболическую реакцию на EGFRi.

Пример 7: Клетки с метаболической реакцией на EGFRi примированы для апоптоза

Нарушения метаболизма глюкозы могут индуцировать экспрессию проапоптозных факторов и стимулировать внутренний апоптоз, предполагая, что снижение поглощения глюкозы в ответ на EGFRi будет стимулировать внутренний путь апоптоза. Действительно, срочная обработка эрлотинибом способствовала экспрессии проапоптозных белков только BH3, BIM и PUMA, только в культурах клеток с метаболической реакцией (фиг. 30A). Однако окрашивание аннексином V показало, что у пациентов с метаболической реакцией был лишь умеренный (~ 17%), хотя и значительно более высокий, апоптоз по сравнению с пациентами без метаболической реакции (~ 3%) после 72 часов воздействия эрлотиниба (фиг. 21C).

Низкий уровень апоптоза, несмотря на выраженную индукцию проапоптозных факторов, заставил авторов изобретения задаться вопросом, не «примирует» ли нарушение поглощения глюкозы с помощью EGFRi клетки GBM для апоптоза; таким образом увеличивая склонность к апоптозу, не вызывая значительной гибели клеток. Чтобы исследовать это, авторы изобретения обрабатывали эрлотинибом как клетки с метаболической реакций, так и клетки без метаболической реакции в течение 24 часов и выполнили динамическое профилирование BH3 для количественной оценки изменений в праймировании апоптоза (фиг. 30B). Используя несколько пептидов BH3 (например, BIM, BID и PUMA), мы наблюдали значительное увеличение праймирования апоптоза, как определено по изменению высвобождения цитохрома с относительно носителя, у клеток с метаболической реакцией с обработкой эрлотинибом (фиг. 21D - темно-серые столбцы). Важно отметить, что праймирование у клеток с метаболической реакцией было значительно выше, чем праймирование у клеток без метаболической реакции (фиг. 21D - светло-серые столбцы), подтверждая предположение, что ослабление поглощения глюкозы с помощью EGFRi запускает праймирование апоптоза в GBM.

Авторы изобретения исследовали, требуется ли пониженное поглощение глюкозы для праймирования апоптоза с помощью EGFRi, проверив, должно ли снижение потребления глюкозы смягчить эти эффекты. Для исследования этого переносчики глюкозы 1 (GLUT1) и 3 (GLUT3) эктопически экспрессировались в двух клетках с метаболической реакцией (HK301 и GBM39). Усиленная экспрессия GLUT1 и GLUT3 (GLUT1/3) восстанавливала EGFRi-опосредованное ослабление поглощения глюкозы и выработки лактата в обеих клеточных линиях (фиг. 21E и фиг. 31A-C) и, что важно, заметно подавляла праймирование апоптоза в ответ на EGFRi (фиг.21F). В совокупности эти данные демонстрируют, что EGFRi-опосредованное ингибирование потребления глюкозы, хотя и недостаточное для индукции значительной гибели клеток, снижает порог апоптоза, потенциально делая клетки GBM уязвимыми для агентов, которые используют это примированное состояние.

Пример 8: Цитоплазматический p53 необходим для праймирования апоптоза с помощью EGFRi

Был исследован механизм, с помощью которого GBM становятся примированными для апоптоза с помощью EGFRi. Ингибирование метаболизма глюкозы, вызванного онкогенами, делает клетки GBM синергически восприимчивыми к цитоплазматическому p53-зависимому апоптозу. Ослабленный метаболический поток глюкозы в GBM посредством нацеливания на онкогенную передачу сигналов (например, EGFRi) приводит к тому, что цитоплазматический p53 вовлекается во внутренний путь апоптоза («праймирование»). Однако Bcl-xL блокирует гибель клеток, опосредованную цитоплазматическим p53. Фармакологическая стабилизация p53 преодолевает этот блок апоптоза, что приводит к взаимоусиливающей летальности с комбинированным нацеливанием на метаболизм глюкозы, вызванный онкогенами, при GBM.

В клетках, которые находятся в примированном состоянии, антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (например, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) в значительной степени загружены проапоптотическими белками BH3 (например, BIM, BID, PUMA, BAD, NOXA, HRK); следовательно, выживание клеток зависит от этих взаимодействий. Белок-супрессор опухолей, p53, как известно, активирует проапоптотические белки, которые впоследствии необходимо связывать антиапоптотическими белками Bcl-2 для предотвращения гибели клеток. Чтобы проверить, необходим ли p53 для EGFRi-индуцированного праймирования, мы подавляли p53 с помощью CRISPR/CAS-9 (далее обозначаемого как p53KO) у двух пациентов с метаболической реакцией (HK301 и HK336, фиг. 22A). В то время как изменение потребления глюкозы с помощью EGFRi не было затронуто в клетках p53KO (фиг. 32A), профилирование BH3 показало, что p53KO почти устраняет индуцированное эрлотинибом праймирование апоптоза как в клетках HK301, так и в HK336 (фиг. 22B).

Поскольку было показано, что транскрипционная активность p53 усиливается при ограничении глюкозы, мы провели исследование, чтобы определить, индуцируется ли опосредованная p53 транскрипция посредством EGFRi. Однако эрлотиниб не увеличивал экспрессию регулируемых p53 генов (например, p21, MDM2, PIG3, TIGAR) (фиг. 32B) и не индуцировал репортерную активность p53-люциферазы в клетках HK301пациента с метаболической реакцией (фиг. 32C). Эти данные показывают, что, хотя p53 необходим для праймирования с помощью EGFRi, его транскрипционная активность может не быть необходимой.

В дополнение к хорошо описанным ядерным функциям p53, p53 может локализоваться в цитоплазме, где он может напрямую взаимодействовать с внутренним путем апоптоза. Чтобы оценить, важен ли цитоплазматический p53 для праймирования апоптоза с помощью EGFRi, мы стабильно вводили мутант p53 с дефектным клеточным сигналом внутриядерной локализации ($p53^{cyto}$) в глиомасферы HK301 и HK336 p53KO. Как и ожидалось, $p53^{cyto}$ экспрессировался (фиг. 22C и фиг. 32D), ограничивался цитоплазмой (фиг. 22D и фиг. 32E) и не имел транскрипционной активности (фиг. 22E и фиг. 32F). Напротив, восстановление p53 дикого типа ($p53^{wt}$) в клетках HK301 и HK336 p53KO обнаруживало локализацию, аналогичную родительским клеткам, и спасало транскрипцию генов, регулируемых p53 (фиг. 22C-E и фиг. 32E-G). Примечательно, что стабильное введение $p53^{cyto}$ значительно восстанавливало праймирование с помощью эрлотиниба в клетках HK301 и HK336 p53KO до уровней, сравнимых с $p53^{wt}$ (фиг. 22F и фиг. 32G), указывая на то, что цитоплазматическая функция p53 необходима для EGFRi-опосредованного праймирования. В подтверждение этого введение транскрипционно активного (фиг. 2622G), но ограниченного в ядре мутанта p53 ($p53^{NES}$) в клетки HK301 p53KO не смогло вызвать EGFRi-опосредованное праймирование апоптоза (фиг. 22G, 22H и 32H). Наконец, фармакологическое ингибирование цитоплазматической активности p53 с помощью пифитрина-μ (PFTμ) заметно снижает праймирование с помощью эрлотиниба (фиг. 32I). В совокупности эти результаты показывают, что цитоплазматический p53 задействует внутренний механизм апоптоза после EGFRi в GBM.

Предыдущие исследования продемонстрировали, что мутанты p53, полученные из опухоли человека, особенно в ДНК-связывающем домене, помимо недостатков трансактивации, снижают цитоплазматические функции. Таким образом, авторы изобретения исследовали, будет ли стабильная экспрессия двух из этих «горячих точек» мутантов p53, R175H или R273H, в HK301 p53KO снижать EGFRi-опосредованное праймирование (фиг. 32H). Как и ожидалось, оба мутанта не обладали способностями к транскрипции (фиг. 22G) и, в соответствии со сниженной цитоплазматической активностью, были неспособны к праймированию апоптоза с помощью EGFRi (фиг. 22H). Следовательно, в соответствии с предыдущими открытиями, онкогенные мутации в ДНК-связывающем домене p53 приводят к «двойным ударам», в результате чего как трансактивация, так и цитоплазматические функции отменяются, последнее имеет значение для праймирования апоптоза с помощью EGFRi.

Пример 9: Ингибирование поглощения глюкозы, вызванного EGFR, создает пригодную для использования зависимость Bcl-xL

Bcl-xL может изолировать цитоплазматический p53 и предотвращать p53-опосредованный апоптоз; тем самым создавая состояние праймирования апоптоза и зависимость выживания от Bcl-xL. Действительно, профилирование BH3 выявило зависимость от Bcl-xL для выживаемости клеток у пациентов с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 33A). Таким образом, мы предположили, что снижение потребления глюкозы с помощью EGFRi может привести к секвестрации цитоплазматического p53 с помощью Bcl-xL. Чтобы исследовать это, мы выполнили коиммунопреципитацию, чтобы изучить динамику взаимодействий p53-Bcl-xL в ответ на EGFRi как у пациентов с реакцией (n=2), так и у пациентов без реакции (n=2). Важно отметить, что мы наблюдали заметно усиление взаимодействий Bcl-xL и p53 после обработки эрлотинибом у пациентов с метаболической реакцией (фиг. 23A), а не у пациентов без метаболической реакции (фиг. 23B). Это предполагает, что ингибирование EGFR-зависимого потребления глюкозы приводит к секвестрации p53 с помощью Bcl-xL. В соответствии с этой интерпретацией эктопическая экспрессия GLUT1/3, которая восстанавливает EGFRi-опосредованное снижение поглощения глюкозы и праймирование апоптоза, предотвращает связывание p53 с Bcl-xL (фиг. 23C и фиг. 33B). Эти данные убедительно показывают, что EGFRi-опосредованное ингибирование поглощения глюкозы подготавливает GBM-клетки к апоптозу, способствуя взаимодействию между цитоплазматическим p53 и Bcl-xL.

Высвобождение p53 из Bcl-xL позволяет p53 напрямую активировать BAX, что приводит к высвобождению цитохрома *c* и гибели клеток. Как только мы обнаружили повышенное связывание между Bcl-xL и p53 в метаболических ответчиках в ответ на EGFRi, мы спросили, вызывает ли смещение p53 из Bcl-xL апоптоз. Для исследования этого, мы обрабатывали клетку с метаболической реакцией (HK301) эрлотинибом и специфическим ингибитором Bcl-xL, WEHI-539. Добавление WEHI-539 нарушило ассоциацию Bcl-xL с p53 при лечении эрлотинибом (фиг. 23D), что привело к синергетической летальности для клеток HK301 и GBM39 (пациенты с метаболической реакцией) (фиг. 23E). Примечательно, что цитоплазматический p53 был достаточным для комбинаторных эффектов в клетках с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 33C). Однако WEHI-539 не усиливал апоптоз у пациентов без метаболической реакции (HK393), получавших эрлотиниб, что позволяет предположить, что ослабление поглощения глюкозы с помощью EGFRi и последующее связывание между p53 и Bcl-xL необходимы для создания зависимости от Bcl-xL для выживания (фиг. 33E). В подтверждение этого принудительная экспрессия GLUT1/3 значительно уменьшала гибель клеток с помощью комбинации лекарственных средств (фиг. 23F и фиг. 33D). Вместе эти наблюдения показывают, что Bcl-xL ослабляет гибель клеток GBM в ответ на EGFRi-опосредованное ингибирование поглощения глюкозы путем секвестрации цитоплазматического p53 (фиг. 32G).

Пример 10: Комбинированное нацеливание на EGFR и p53 является синергическим для пациентов с метаболической реакцией на EGFRi

Исследования механизма действия выявили потенциальную терапевтическую возможность в GBM, вызванных EGFR, которая будет зависеть от функционального p53. В то время как ось передачи сигналов p53 является одним из трех основных путей, измененных при GBM, анализ набора данных TCGA для GBM продемонстрировал, что мутации p53 являются взаимоисключающими с изменениями в EGFR (фиг. 28A и 28B). Напротив, у пациентов с мутациями или накоплением EGFR путь p53 может быть подавлен посредством амплификации MDM2 и/или делеций в негативном регуляторе MDM2, p14 ARF, в локусе CDKN2A. Учитывая эти отношения и потребность в p53 для праймирования при поглощении глюкозы, ослабленном EGFRi, мы предположили, что стабилизация p53 посредством ингибирования MDM2 может иметь терапевтические эффекты, аналогичные антагонизму Bcl-xL. Используя нутлин, широко изученный ингибитор MDM2, мы обнаружили поразительную взаимоусиливающую летальность в комбинации с эрлотинибом в глиомасфере пациента с метаболической реакцией. Более 90% клеток HK301 подверглись апоптозу комбинацией эрлотиниба и нутлина (фиг. 24C). Примечательно, что мы не наблюдали синергизма между этими лекарственными средствами у пациента без метаболической реакции (GS017, фиг. 24C). Затем мы протестировали эту комбинацию на нашей панели первичных клеток GBM (все p53 дикого типа) и обнаружили взаимоусиливающую летальность только в GBM с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 24D и фиг. 34A). Генетический нокдаун *EGFR* подтвердил синергизм только у пациентов с метаболической реакцией (фиг. 34B). Важно отметить, что вызванная искусственно экспрессия GLUT1/3 значительно снизила олигермизацию BAX, высвобождение цитохрома c и апоптоз при комбинации эрлотиниба и нутлина (фиг. 24E и фиг. 34C), подтверждая идею, что ингибирование метаболизма глюкозы с помощью EGFRi необходимо для синергических эффектов комбинации эрлотиниба и нутлина.

Затем была исследована роль p53 в индукции гибели клеток при комбинации эрлотиниба и нутлина. Как и ожидалось, нацеливание CRISPR/CAS-9 на p53 в двух клетках с метаболической реакцией на EGFRi (HK301 и HK336) полностью снижало чувствительность к комбинации лекарственных средств (фиг. 24F). Аналогично эктопическая экспрессия Bcl-xL заметно подавляла гибель клеток при комбинированной обработке, что согласуется с важной функцией Bcl-xL в противодействии апоптозу, опосредованному p53 (фиг. 34D). Более того, аналогично результатам с ингибированием Bcl-xL (например, WEHI-539), добавление нутлина высвобождало p53 из Bcl-xL при обработке эрлотинибом (фиг. 24G). Эти данные согласуются с предыдущими наблюдениями о том, что стабилизация p53 может стимулировать цитоплазматический p53-опосредованный апоптоз. В подтверждение предположения о том, что цитоплазматическая активность p53 необходима для EGFRi и индуцированного нутлином апоптоза у пациентов с метаболической реакцией, блокирование цитоплазматической активности p53 с помощью PFTμ значительно снизило синергические эффекты комбинации (фиг. 34E), в то время как клетки HK301, содержащие ограниченный ядром мутант p53, $p53^{NES}$, были неспособны к усилению апоптоза с помощью эрлотиниба и нутлина (фиг. 34F). Наконец, мутанты «горячей точки» рака, R175H и R273H, которые обладают как трансактивацией, так и цитоплазматической недостаточностью, были полностью нечувствительны к комбинации лекарственных средств (фиг. 34F).

Хотя желательно, чтобы цитоплазматический p53 способствовал гибели клеток с помощью комбинации лекарственных средств, мы наблюдали в некоторых случаях, что как транскрипционно-зависимые, так и независимые функции p53 необходимы для оптимального выполнения синергического апоптоза с помощью нутлина (фиг. 34F). Эти результаты согласуются с отчетами о том, что независимые от транскрипции функции p53 могут самостоятельно выполнять внутренний апоптоз, тогда как в других контекстах могут потребоваться его зависимые от транскрипции функции для стимуляции опосредованного цитоплазматическим p53 уничтожения клеток. В совокупности описанные в данном документе результаты показывают, что комбинированное нацеливание на EGFR-вызванный метаболизм глюкозы и p53 может вызывать заметную синергическую гибель клеток в первичной GBM; что зависит от цитоплазматических функций p53.

Пример 11: Модуляция метаболизма глюкозы вызывает у пациентов без метаболической реакции на EGFRi p53-опосредованную гибель клеток

Вышеупомянутые данные побудили авторов изобретения предложить модель, в которой EGFRi-опосредованное ослабление метаболизма глюкозы запускает механизм апоптоза, приводя к синергизму с проапоптозными стимулами, такими как активация p53. Синергизм заключается между индукцией клеточного стресса ингибиторами EGFR, снижением поглощения глюкозы и примированием клетки для апоптозу и стабилизацией p53 антагонистами BCL-2. Ингибирование EGFR может быстро ослабить гликолиз при клеточном стрессе. Это создает опухолеспецифичную уязвимость, при которой внутренний апоптоз может быть значительно усилен: 1) активацией p53 (например, через нутлин, аналоги или другие вещества, описанные в данном документе) и 2) ингибированием BCL-2 (любым из нескольких агентов, как описано в данном документе, таких как, например, ABT-263 (Navitoclax).

Логическое предсказание этой модели состоит в том, что прямое ингибирование метаболизма глюкозы должно делать фенокопии эффектов EGFRi. В соответствии с этим добавление метаболического ингибитора глюкозы 2-дезоксиглюкозы (2DG) стимулировало праймирование апоптоза, связывание p53 с Bcl-xL и синергизм с нутлином в клетках HK301 (пациент с метаболической реакцией на EGFRi) (фиг. 40A, 40B и 40D). Интересно, что ингибирование окислительного фосфорилирования олигомицином (комплекс V/АТФ-синтаза) или ротеноном (комплекс I) не действует синергически с обработкой нутлином в глиомасферах HK301 (фиг. 35C и 35D). Таким образом, только снижение метаболического потока глюкозы, но не окислительного метаболизма, оказывается достаточным для синергической чувствительности к активации p53.

Это побудило авторов изобретения задуматься о том, приводит ли модуляция потребления глюкозы у пациентов без метаболической реакции на EGFRi к аналогичной p53-зависимой уязвимости. Чтобы исследовать это, они проверили, вызывает ли прямое ингибирование поглощения глюкозы с помощью 2DG или нацеливание на PI3K (хорошо охарактеризованный фактор метаболизма глюкозы) праймирование апоптоза у двух пациентов без метаболической реакции на EGFRi (фиг. 25A). В отличие от обработки эрлотинибом, срочное ингибирование PI3K с помощью пиктилисиба отменяет передачу сигналов PI3K-AKT-mTOR (фиг. 35E) и значительно снижает поглощение ^{18}F-FDG клетками HK393 и HK254 (фиг. 25B). Снижение потребления глюкозы с помощью пиктилисиба было связано со значительно более высоким праймированием апоптоза и, как и ожидалось, 2DG полностью отражал эти эффекты (фиг. 25B и C). Следовательно, клетки без метаболической реакции на EGFRi могут быть примированы для апоптоза после ингибирования поглощения глюкозы. Важно отметить, что нацеливание CRISPR/CAS-9 на p53 в HK393 значительно подавляло праймирование, опосредованное 2DG или пиктилисибом (фиг. 25D). Более того, p53-зависимое праймирование было связано с повышенным связыванием Bcl-xL и p53, что указывает на разрушение p53 с помощью Bcl-xL для блокирования апоптоза (фиг. 25E и фиг. 35F). В соответствии с этой интерпретацией комбинирование 2DG или пиктилисиба с нутлином вызывало значительную p53-зависимую взаимоусиливающую летальность в клетках без метаболической реакции на EGFRi (фиг. 25F и 25G). Вместе эти данные демонстрируют, что срочное ингибирование метаболизма глюкозы, либо напрямую, либо с помощью нацеленной терапии, способствует p53-зависимому праймированию апоптоза при GBM; что создает целевую уязвимость для улучшенного уничтожения клеток.

Пример 12: Комбинаторная терапевтическая стратегия и неинвазивный биомаркер для нацеливания на GBM *in vivo*

Результаты, полученные на клеточной культуре, показывают, что комбинированное нацеливание на онкоген-вызванный метаболизм глюкозы и p53 обладает синергической активностью в первичной GBM. Это побудило нас исследовать, может ли этот подход быть эффективным в моделях ортотопических ксенотрансплантатов GBM. Для этих исследований мы использовали мощный ингибитор MDM2, идасанутлин, который в настоящее время проходит клинические испытания для лечения многих злокачественных новообразований. Учитывая неопределенность проникновения идасанутлина в ЦНС, мы впервые продемонстрировали, что идасанутлин может накапливаться в головном мозге мышей с неповрежденным гематоэнцефалическим барьером (мозг: плазма крови, 0,35) и стабилизирует p53 у ортотопических мышей, несущих опухоль (фиг. 41A и фиг. 41B).

Далее, поскольку нарушения метаболизма глюкозы с ингибированием онкогенов необходимы для синергической чувствительности к активации p53, мы пришли к выводу, что быстрое ослабление поглощения глюкозы *in vivo* после введения EGFRi, измеряемое с помощью ^{18}F-FDG PET, может служить неинвазивным прогностическим биомаркером для терапевтической эффективности комбинированной обработки эрлотиниб+идасанутлин (фиг. 26A). Мы наблюдали в ортотопических ксенотрансплантатах глиомасферы пациента с метаболической реакцией на EGFR (GBM39), что срочная обработка эрлотинибом (75 мг/кг) быстро снижала поглощение ^{18}F-FDG (через 15 часов после введения эрлотиниба) (фиг. 26B и фиг. 36C). На отдельных группах мышей они тестировали отдельные лекарственные средства и комбинацию ежедневной обработки эрлотинибом (75 мг/кг) и идасанутлином (50 мг/кг). Относительно контроля с одним агентом мы наблюдали синергическое ингибирование роста, как определено с помощью секретируемой люциферазы *gaussia*, у мышей, несущих внутричерепную опухоль GBM39, с минимальной токсичностью (фиг. 26B и фиг. 36D). Напротив, ортотопические ксенотрансплантаты пациента без метаболической реакции (HK393) не показали ни изменений в поглощении ^{18}F-FDG при срочном EGFRi (фиг. 26D и фиг. 36C), ни синергической активности при комбинации эрлотиниба и идасанутлина (фиг. 26E). Таким образом, неинвазивная ПЭТ с ^{18}F-FDG, используемая для измерения быстрых изменений поглощения глюкозы с помощью EGFRi, была эффективна в прогнозировании последующей синергической чувствительности к комбинации эрлотиниба и идасанутлина.

Наконец, мы оценили влияние комбинации лекарственных средств на общую выживаемость в ортотопических ксенотрансплантатах либо двух пациентов с метаболической реакцией на EGFRi (GBM39 и HK336), либо двух пациентов без метаболической реакции (HK393 и GS025). Все опухоли были p53 дикого типа (фиг. 29A). После доказательства роста опухоли (как определено с помощью люциферазы *gaussia*) мыши получали носитель, эрлотиниб, идасанутлин или комбинацию в течение до 25 дней. Комбинация лекарственных средств привела к выраженному увеличению выживаемости только в опухолях GBM пациентов с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 30F-I). Вместе эти данные показывают, что комбинированное нацеливание на EGFR и p53 синергически ингибирует рост и продлевает выживаемость в подмножестве ортотопических ксенотрансплантатов GBM с p53 дикого типа. Важно отметить, что ПЭТ с ^{18}F-FDG был ценным неинвазивным прогностическим биомаркером чувствительности к этой новой комбинированной терапевтической стратегии.

Пример 13: Прямое ингибирование гликолиза с помощью 2DG или цитохалазина B

Было исследовано, как прямое ингибирование гликолиза с помощью ингибитора гексокиназы (2DG) и ингибитора переносчика глюкозы (цитохалазин B) влияет на активацию p53 нутлином. Результаты, показанные на фиг. 37, демонстрируют, что низкий уровень глюкозы (0,25 мМ) приводит к синергическому уничтожению клеток с ингибированием BCL-xL с помощью навитоклакса или нутлина. Гибель клеток определяли с использованием окрашивания аннексином V в образцах глиомасферы, обработанных в течение 72 часов гликолитическими ингибиторами 2DG или цитохалазином B в качестве отдельных агентов или в комбинации с активатором p53, нутлином. Те же эффекты были воспроизведены путем культивирования глиомасфер в условиях низкого содержания глюкозы (0,25 мМ) и обработки их нутлином или навитоклаксом (ABT-263) в течение 72 часов.

Пример 14: Экспериментальные процедуры

Мыши

Самки NOD *scid* gamma (NSG) в возрасте 6-8 недель были приобретены в учреждении по разведению животных медицинского центра Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе (UCLA). Самцов мышей CD-1 в возрасте 6-8 недель приобретали в Charles River. Всех мышей содержали в определенных условиях без патогенной флоры, в одобренном AAALAC учреждении для животных Отделения лабораторных животных (DLAM) в UCLA. Все эксперименты на животных проводились с одобрения Управления по надзору за ресурсами животных Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе (OARO).

Клетки GBM, полученные от пациентов

Вся ткань пациента для получения культур клеток GBM была получена на основе явного информированного согласия с использованием протокола UCLA Institutional Review Board (IRB): 10-00065. Как описано ранее, первичные клетки[12] GBM были созданы и поддержаны в условиях глиомасферы, состоящих из DMEM/F12 (Gibco), B27 (Invitrogen), пенициллин-стрептомицин (Invitrogen) и глутамакса (Invitrogen) с добавлением гепарина (5 мкг/мл, Sigma), EGF (50 нг/мл, Sigma) и FGF (20 нг/мл, Sigma). Все клетки выращивали при 37°C, 20% O_2 и 5% CO_2 и регулярно контролировали и давали отрицательный результат на наличие микоплазмы с использованием коммерчески доступного набора (MycoAlert, Lonza). Во время экспериментов большинство используемых линий HK находились между 20-30 пассажами (за исключением HK385 p8, HK336 p15), в то время как линии GS и GBM39 имели менее 10 пассажей. Все клетки были аутентифицированы с помощью анализа коротких тандемных повторов (STR).

Реагенты и антитела

Химические ингибиторы из следующих источников были растворены в ДМСО для исследований in vitro: эрлотиниб (Chemietek), нутлин-3A (Selleck Chemicals), WEHI-539 (APExBIO), пиктилисиб (Selleck Chemicals), олигомицин (Sigma), ротенон (Sigma), 2DG (Sigma) растворяли в среде перед использованием. Антитела, используемые для иммуноблоттинга, были получены из перечисленных источников: β-актин (Cell signaling, 3700), тубулин (Cell signaling, 3873), p-EGFR Y1086 (Thermo Fischer Scientific, 36-9700), t-

EGFR (Millipore, 06-847), t-AKT (Cell Signaling, 4685), p-AKT T308 (Cell Signaling, 13038), p-AKT S473 (Cell Signaling, 4060), t-ERK (Cell Signaling, 4695), p-ERK T202/Y204 (Cell Signaling, 4370), t-S6 (Cell Signaling, 2217), p-S6 S235/236 (Cell Signaling, 4858), t-4EBP1 (Cell Signaling, 9644), p-4EBP1 S65 (Cell Signaling 9451), Glut3 (Abcam, ab15311), Glut1 (Millipore, 07-1401), p53 (Santa Cruz Biotechnology, SC-126), BAX (Cell Signaling, 5023), BIM (Cell Signaling, 2933), Bcl-2 (Cell Signaling, 2870), Bcl-xL (Cell Signaling, 2764), Mcl-1 (Cell Signaling, 5453), цитохром с (Cell Signaling, 4272) и расщепленная каспаза-3 (Cell Signaling, 9661). Антитела, используемые для иммунопреципитации, были получены из перечисленных источников: p53 (Cell Signaling, 12450) и Bcl-xL (Cell Signaling, 2764). Вторичные антитела были получены из перечисленных источников: антитела против IgG кролика, связанные с HRP (Cell Signaling, 7074), и антитела против IgG мыши, связанные с HRP (Cell Signaling, 7076). Все антитела для иммуноблоттинга использовали в разведении 1:1000, за исключением β-актина и тубулина, которые использовали в соотношении 1:10 000. Антитела для иммунопреципитации разводили в соответствии с инструкциями производителя (1:200 для p53 и 1:100 для Bcl-xL). Вторичные антитела использовали в разведении 1:5000.

Анализ поглощения ^{18}F-фтордезоксиглюкозы (18F-FDG)

Клетки высевали из расчета 5 × 10^4 клеток/мл и обрабатывали назначенными лекарственными средствами в указанные моменты времени. После соответствующей обработки клетки собирали и ресуспендировали в не содержащей глюкозу среде DMEM/F12 (USBiological), содержащей ^{18}F-FDG (радиоактивность 1 мкКи/мл). Клетки инкубировали при 37°C в течение 1 часа, а затем трижды промывали ледяным PBS. Затем измеряли радиоактивность каждого образца с помощью счетчика гамма-излучения.

Измерения глюкозы, глутамина и лактата

Потребление клетками глюкозы и продуцирование лактата измеряли с помощью основной программы анализатора Nova Biomedical BioProfile. Вкратце, клетки высевали из расчета 1 × 10^5 клеток/мл в 2 мл условий глиомасферы и соответствующих условий лекарственного средства (n=5). Через 12 часов после обработки лекарственным средством из каждого образца удаляли 1 мл среды и анализировали в анализаторе Nova BioProfile. Измерения были нормализованы по количеству клеток.

Анализ апоптоза с помощью аннексина V

Клетки собирали и анализировали на окрашивание аннексином V и PI в соответствии с протоколом производителя (BD Biosciences). Вкратце, клетки высевали из расчета 5 × 10^4 клеток/мл и обрабатывали соответствующими лекарственными средствами. В указанные моменты времени клетки собирали, обрабатывали трипсином, промывали PBS и окрашивали аннексином V и PI в течение 15 минут. Затем образцы анализировали с помощью проточного цитометра BD LSRII.

Иммуноблоттинг

Клетки собирали и лизировали в буфере RIPA (Boston BioProducts), содержащем протеазу Halt и ингибитор фосфатазы (Thermo Fischer Scientific). Лизаты центрифугировали при 14000 об. в течение 15 минут при 4°C. Затем образцы белка кипятили в буфере для образцов NuPAGE LDS (Invitrogen) и восстанавливающем агенте для образцов NuPAGE (Invitrogen), разделяли с помощью SDS-PAGE на 12% Bis-Tris гелях (Invitrogen) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare). Иммуноблоттинг выполняли в соответствии с указаниями производителя антител и, как упоминалось ранее. Мембраны были разработаны с использованием системы SuperSignal (Thermo Fischer Scientific).

Иммунопреципитация

Клетки собирали, один раз промывали PBS и инкубировали в буфере для лизиса IP (25 мМ Tris-HCL pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1% NP-40, 5% глицерина) при 4°C в течение 15 минут. Затем 300-500 мкг каждого образца предварительно очищали в гранулах с агарозой Protein A/G Plus (Thermo Fischer Scientific) в течение одного часа. После предварительной очистки образцы затем инкубировали с конъюгатами антитело-гранулы в течение ночи в соответствии с указаниями производителя и как упоминалось выше. Затем образцы центрифугировали при 1000 g в течение 1 мин., и гранулы пять раз промывали 500 мкл буфера для лизиса IP. Белки элюировали из гранул кипячением в 2х буфере для образцов LDS (Invitrogen) при 95°C в течение 5 минут. Образцы анализировали с помощью иммуноблоттинга, как описано выше. Антитела для иммунопреципитации разводили в соответствии с инструкциями производителя (1:200 для p53 и 1:100 для Bcl-xL).

Динамическое профилирование BH3

Глиомасферы GBM сначала были разделены на одноклеточные суспензии с помощью TrypLE (Gibco) и ресуспендированы в буфере MEB (150 мМ маннита, 10 мМ HEPES-KOH, 50 мМ KCl, 0,02 мМ EGTA, 0,02 мМ ЭДТА, 0,1% BSA, 5 мМ сукцината). 50 мкл клеточной суспензии (3×10^4 клеток/лунка) помещали в лунки, содержащие 50 мкл буфера MEB, содержащего 0,002% дигитонина и указанных пептидов, в 96-луночные планшеты. Затем планшеты инкубировали при 25°C в течение 50 мин. Затем клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 минут с последующей нейтрализацией буфером N2 (1,7 M Tris, 1,25 M глицин, pH 9,1) в течение 5 минут. Образцы окрашивали в течение ночи с помощью 20 мкл окрашивающего раствора (10% BSA, 2% Tween 20 в PBS), содержащего DAPI и антицитохром *c* (BioLegend). На следующий день высвобождение цитохрома *c* определяли количественно с помощью проточного цитометра BD LSRII. Измерения были нормализованы до соответствующих контролей, которые не способствуют высвобождению цитохрома *c* (ДМСО и неактивный пептид PUMA2A). Дельта-праймирование относится к разнице в количестве высвобождения цитохрома *c* между клетками, обработанными носителем, и клетками, обработанными лекарственным средством.

Олигомеризация BAX

$7{,}5 \times 10^5$ клеток обрабатывали указанными лекарственными средствами. Через 24 часа после обработки клетки собирали, один раз промывали ледяным PBS и ресуспендировали в 1 мМ бисмалеимидогексане (BMH) в PBS в течение 30 минут. Затем клетки осаждали и лизировали для иммуноблоттинга, как описано выше.

Обнаружение цитохрома с

5 миллионов клеток высевали при концентрации 1×10^5 клеток/мл и обрабатывали указанными лекарственными средствами. Через 24 часа после обработки клетки собирали, один раз промывали ледяным PBS. Затем проводили субклеточное фракционирование с использованием набора для выделения митохондрий (Thermo Fischer Scientific, 89874). И цитоплазматические, и митохондриальные фракции подвергали иммуноблоттингу, и цитохром *c* обнаруживали с использованием антитела к цитохрому *c* в разведении 1:1000 (Cell Signaling, 4272).

Исследования ксенотрансплантата мышей

Для внутричерепных экспериментов клетки GBM39, HK336, HK393 и GS025 вводили (4×10^5 клеток на инъекцию) в правое полосатое тело головного мозга самок мышей NSG (возраст 6-8 недель). Координаты инъекции были 2 мм вбок и 1 мм сзади от брегмы на глубине 2 мм. Массу опухоли контролировали с помощью секретируемой люциферазы *gaussia*, и после трех последовательных измерений роста мышей рандомизировали в четыре группы лечения, состоящие из соответствующих носителей, 75 мг/кг эрлотиниба, 50 мг/кг идасанутлина или комбинации обоих лекарственных средств. Носитель состоял из 0,5% метилцеллюлозы в воде, которая используется для растворения эрлотиниба, и запатентованного препарата, полученного от Roche, который используется для растворения идасанутлина. Массу опухоли оценивали дважды в неделю с помощью секретируемой люциферазы *gaussia*. По возможности, мышей лечили в течение 25 дней, прекращали лечение и наблюдали за выживаемостью. Лекарственные средства вводились через желудочный зонд. Размеры выборки были выбраны на основе оценок пробных экспериментов и результатов предыдущих литературных источников.[12] Исследователи были осведомлены о распределении групп или оценке результатов. Все исследования проводились в соответствии с руководящими принципами протокола UCLA OARO.

Внутричерепная отложенная ПЭТ/КТ-визуализация мышей

Мышам вводили указанную дозу эрлотиниба в указанное время, затем предварительно нагревали, обезболивали 2% изофлураном и внутривенно вводили 70 мкКи ^{18}F-FDG. После 1 часа бессознательного поглощения мышей выводили из анестезии, но держали в тепле еще 5 часов. Через 6 часов после первоначального введения ^{18}F-FDG мышей визуализировали с помощью ПЭТ/КТ-сканера G8 (Sofie Biosciences). Как указано выше, количественная оценка была выполнена путем рисования трехмерных представляющих интерес областей (ROI) с использованием программного обеспечения AMIDE.

Иммуногистохимия

Иммуногистохимию проводили на срезах 4 мкм, которые были вырезаны из блоков FFPE (фиксированные формалином, залитые парафином). Затем срезы депарафинировали ксилолом и регидратировали с помощью градуированного этанола. Извлечение антигена было достигнуто с помощью устройства Nuclear Decloaker с pH 9,5 (Biocare Medical) в автоклаве Decloaking при 95°C в течение 40 мин. Затем срезы тканей обрабатывали 3%

перекисью водорода (LOT 161509; Fisher Chemical) и Background Sniper (Biocare Medical, Конкорд, Калифорния, США) для уменьшения неспецифичного фонового окрашивания. Первичные антитела к p53 (Cell Signaling, 2527) применяли в разведении 1:150 в течение 80 мин. с последующим обнаружением с помощью набора для обнаружения MACH 3 Rabbit HRP-Polymer (Biocare Medical). Визуализация была достигнута с использованием VECTOR NovaRED (SK-4800; Vector Laboratories, Inc.) в качестве хромогена. Наконец, срезы были контрастно окрашены автоматическим гематоксилином Tacha (Biocare Medical).

Количественная ОТ-ПЦР

РНК экстрагировали из всех клеток с помощью набора РНК Purelink (Invitrogen). кДНК синтезировали с помощью набора для синтеза кДНК iScript (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. Количественная ПЦР (qPCR) была проведена на Roche LightCycler 480 с использованием SYBRGreen Master Mix (Kapa Biosciences). Значения относительной экспрессии нормализованы для контрольного гена (*GAPDH*). Последовательности праймеров, которые перечислены (в направлении от 5' к 3'): P21 (прямая GACTTTGTCACCGAGACACC, обратная GACAGGTCCACATGGTCTTC), PUMA (прямая ACGACCTCAACGCACAGTACG, обратная GTAAGGGCAGGAGTCCCATGATG), GAPDH (прямая TGCCATGTAGACCCCTTGAAG, обратная ATGGTACATGACAAGGTGCGG), MDM2 (прямая CTGTGTTCAGTGGCGATTGG, обратная AGGGTCTCTTGTTCCGAAGC), Tigar (прямая GGAAGAGTGCCCTGTGTTTAC, обратная GACTCAAGACTTCGGGAAAGG), PIG3 (прямая GCAGCTGCTGGATTCAATTA, обратная TCCCAGTAGGATCCGCCTAT).

Репортерная активность P53

Сначала клетки инфицировали лентивирусом, синтезированным из репортерной плазмиды p53, которая кодирует люциферазу под контролем чувствительного к p53 элемента:
TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGTGCCTTGCCTGGACTTGCCTGGCCTTGCCTTGG G. Затем инфицированные клетки помещали в 96-луночный планшет при концентрации 5000 клеток/50 мкл и обрабатывали указанными лекарственными средствами в течение 24 часов, а затем инкубировали с 1 мМ D-люциферином в течение двух часов. Биолюминесценцию измеряли с помощью IVIS Lumina II (Perkin Elmer).

Генетическая манипуляция

Обычно лентивирус, используемый для генетических манипуляций, получали путем трансфекции клеток 293-FT (Thermo) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). Вирус собирали через 48 часов после трансфекции. Лентивирусный вектор sgp53 и контрольный вектор sg содержали следующие направляющие РНК, соответственно: CCGGTTCATGCCGCCCATGC и GTAATCCTAGCACTTTTAGG. В качестве основы использовался LentiCRISPR-v2. КДНК Glut1 и Glut3 клонировали из коммерчески доступных векторов и включали в лентивирусный остов pLenti-GLuc-IRES-EGFP, содержащий промотор CMV (Glut1 был подарен Wolf Frommer (Addgene # 18085[44]), Glut3 был получен от OriGene # SC115791, а лентивирусный остов был получен от Targeting

Systems # GL-GFP). pMIG Bcl-xL был подарен Stanley Korsmeyer (Addgene # 8790[45]) и клонирован в лентивирусный остов, упомянутый выше (Targeting Systems). Цитоплазматические (K305A и R306A) конструкции p53 дикого типа были любезным подарком от R. Agami и G. Lahav. Представляющие интерес гены клонировали в лентивирусный вектор, содержащий промотор PGK. Конструкции для мутантов ДНК-связывающего домена p53 (R175H) и (R273H), а также ядерного мутанта (L348A и L350A) были созданы с использованием сайт-направленного мутагенеза (New England Biolabs # E0554S) на конструкции p53 дикого типа.

Для экспериментов по нокдауну EGFR миРНК против EGFR (Thermo Fischer Scientific, s563) трансфицировали в клетки с использованием DharmaFECT 4 (Dharmacon). Через 48 часов клетки собирали и использовали для указанных экспериментов.

Иммунофлуоресценция

Для иммунофлуоресценции глиомасферы сначала диссоциировали с одиночными клетками и прикрепляли к 96-луночным планшетам с использованием Cell-Tak (Corning) в соответствии с инструкциями производителя. Затем прикрепленные клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 10 мин., затем трижды промывали PBS. Затем клетки инкубировали с блокирующим раствором, содержащим 10% FBS и 3% BSA в PBS, в течение 1 часа, а затем инкубировали с антителом p53 (Santa Cruz, SC-126, разведение 1:50) в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки инкубировали с вторичным антителом (Alexa Fluor 647, разведение 1:2000) в течение часа и окрашиванием DAPI в течение 10 минут, затем визуализировали с помощью микроскопа Nikon TI Eclipse, оснащенного флуоресцентной камерой Cascade II (Roper Scientific). Клетки были визуализированы с излучениями при 461 нМ и 647 нМ, а затем обработаны с использованием программного обеспечения для анализа NIS-Elements AR.

Измерения скорости потребления кислорода (OCR) и скорости внеклеточного закисления (ECAR)

Для метаболических измерений с использованием OCR и ECAR глиомасферы, обработанные указанными лекарственными средствами, сначала диссоциировали с суспензиями отдельных клеток и прикрепляли к планшетам XF24 (Seahorse Bioscience) с помощью Cell-Tak (Corning) в соответствии с инструкциями производителя. Перед анализом в клетки добавляли небуферную среду DMEM и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. перед началом измерений OCR и ECAR. Показаны основные измерения ECAR между клетками, обработанными контролем, и клетками, обработанными эрлотинибом.

Подготовка образцов для масс-спектроскопии

Самцам мышей CD-1 (возраст 6-8 недель) вводили 50 мг/кг идасанутлина в двух экземплярах через пероральный зонд. Через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 часа после введения мышей умерщвляли, собирали кровь путем ретроорбитального обескровливания и собирали ткань мозга. Цельную кровь мышей центрифугировали для выделения плазмы крови. Идасанутлин выделяли методом жидкостной экстракции из плазмы крови: 50 мкл плазмы крови добавляли к 2 мкл внутреннего стандарта и 100 мкл ацетонитрила. Ткань мозга мыши промывали 2 мл холодного PBS и гомогенизировали с использованием гомогенизатора тканей с 2 мл только что полученного холодного PBS. Затем идасанутлин выделяли и восстанавливали аналогичным образом путем жидкостной экстракции: 100 мкл гомогената головного мозга добавляли к 2 мкл внутреннего стандарта и 200 мкл ацетонитрила. После перемешивания на вортексе образцы центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли и выпаривали на ротационном испарителе и восстанавливали в 100 мкл 50:50 вода:ацетонитрил.

Обнаружение идасанутлина с помощью масс-спектрометрии

Хроматографические разделения выполняли на колонке Phenomenex Kinetex C18 размером 100×2,1 мм (Kinetex) с использованием системы 1290 Infinity LC (Agilent). Подвижная фаза состояла из растворителя A: 0,1% муравьиной кислоты в воде Milli-Q и B: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Анализируемые вещества элюировали градиентом 5% B (0-4 мин.), 5-99% B (4-32 мин.), 99% B (32-36 мин.), а затем возвращали к 5% B в течение 12 минут до восстановления равновесия между инъекциями. В хроматографическую систему вводили 20 мкл при скорости потока растворителя 0,10 мл/мин. Масс-спектрометрию проводили на трехквадрупольной системе ЖХ/МС 6460 (Agilent). Ионизация была достигнута с помощью электрораспыления в положительном режиме, а сбор данных производился в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). MRM переход, используемый для обнаружения идасанутлина, был m/z 616,2 → 421,2 с напряжением фрагментатора 114 В и энергией столкновения 20 эВ. Сигнал анализируемого вещества нормализовали по внутреннему стандарту, и концентрации определяли путем сравнения с калибровочной кривой (0,5, 5, 50, 250, 500, 2000 нМ). Концентрации идасанутлина в головном мозге были скорректированы на 1,4% веса мозга мыши для остатка крови в сосудистой сети головного мозга.

Измерения секретируемой люциферазы gaussia

Клетки инфицировали лентивирусным вектором, содержащим репортерный ген секретируемой люциферазы *gaussia* (sGluc) (Targeting Systems # GL-GFP), и интракраниально имплантировали в правое полосатое тело мышей (4×10^5 клеток/мышь). Для измерения уровней секретируемой люциферазы Gaussia (sGluc) из хвостовой вены мышей собирали 6 мкл крови и сразу же смешивали с 50 мМ ЭДТА для предотвращения коагуляции. Активность Gluc определяли путем измерения хемилюминесценции после инъекции 100 мкл 100 мкМ целентеразина (Nanolight) в 96-луночный планшет.

Расчет баллов синергизма

$1,0 \times 10^5$ клеток GBM высевали в трех экземплярах и обрабатывали эрлотинибом, нутлином или комбинацией в нескольких концентрациях с использованием матрицы, где каждое лекарственное средство добавляли к клеткам в шести концентрациях (0-10 мкМ). Окрашивание аннексином V измеряли через 72 часа после обработки. Используя программное обеспечение Chalice, реакцию комбинации сравнивали с ее отдельными агентами. Комбинаторные эффекты рассчитывались с использованием балла синергизма.

Секвенирование ДНК

Нацеленное секвенирование было выполнено для образцов HK206, HK217, HK250, HK296 для следующих генов BCL11A, BCL11B, BRAF, CDKN2A, CHEK2, EGFR, ERBB2, IDH1, IDH2, MSH6, NF1, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RB1, TP53 с использованием Illumina Miseq. Было от 1 до 2 миллионов считываний на образец со средним охватом 230 на ген. Для этих образцов были определены варианты числа копий с использованием массива SNP для всего генома. Генетический профиль GBM39 ранее описывался в литературе.

Полное секвенирование экзома было выполнено для образцов HK157, HK229, HK248, HK250, HK254, HK296, HK301, HK336, HK350, HK390, HK393 и выполнено в SeqWright. Образцы были сгруппированы в 2 группы с отдельными реакциями захвата. Использовали быстрый захват Nextera и подготовку библиотеки, а секвенирование выполняли на HiSeq 2500, 2×100 п.о. со 100-кратным охватом мишени, 2 полными быстрыми прогонами, каждый с 1 нормальным диплоидным контролем. Анализ числа копий для этих образцов проводили с использованием программного обеспечения EXCAVATOR.

Примечание образцов TCGA

273 образца GBM из TCGA были проанализированы на генетические изменения в путях, регулируемых EGFR, p53 и p53. Была изучена совместная встречаемость мутаций и отображены только значимые взаимодействия. Данные были проанализированы с помощью cBioPortal, как описано ранее.

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)

Флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) выполняли с использованием коммерчески доступного флуоресцентно меченного двухцветного зонда EGFR (красный)/CEP 7 (зеленый) (Abbott-Molecular). Гибридизацию и анализ FISH проводили на клеточных линиях в соответствии с протоколами, предложенными производителем. Клетки докрашивали с помощью DAPI, и сигналы флуоресцентного зонда визуализировали под флуоресцентным микроскопом Zeiss (Axiophot), оборудованным двухцветными и трехцветными фильтрами.

Статистический анализ.

Сравнения проводились с использованием двусторонних непарных t-критериев Стьюдента, и значения $p < 0{,}05$ считались статистически значимыми. Предполагалось, что все данные из нескольких независимых экспериментов имеют нормальную дисперсию. Данные представляют собой средние значения ± значения стандартной ошибки среднего. Все статистические анализы были рассчитаны с использованием Prism 6.0 (GraphPad). Для всех экспериментов in vitro и in vivo не использовался статистический метод для предварительного определения размера образца, и образцы не были исключены. Для измерений опухолей in vivo последние наборы данных использовались для сравнения между группами. Как описано выше, все мыши были рандомизированы перед исследованиями.

Пример 15: Иллюстративные принципы разработки для определенных соединений серии JFK

Определенные соединения по настоящему изобретению были разработаны в соответствии со схемой 1.

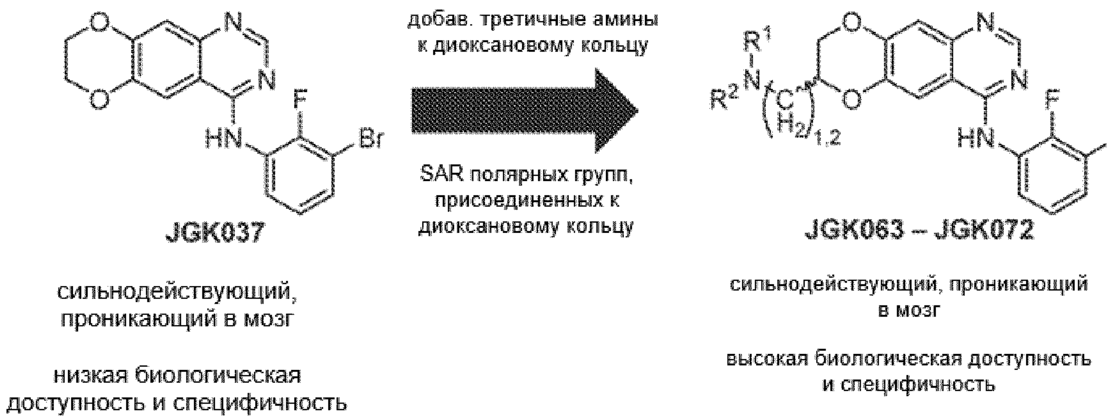


Схема 1.

Пример 16: Получение дополнительных иллюстративных соединений серии JGK

Иллюстративные соединения по настоящему изобретению были получены в соответствии со следующими способами.

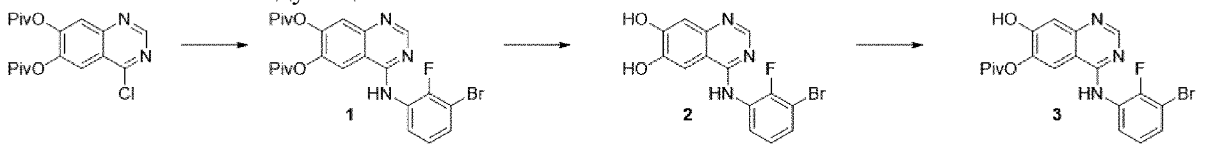


Схема 1. Синтез монозащищенного промежуточного соединения хиназолина **3**.

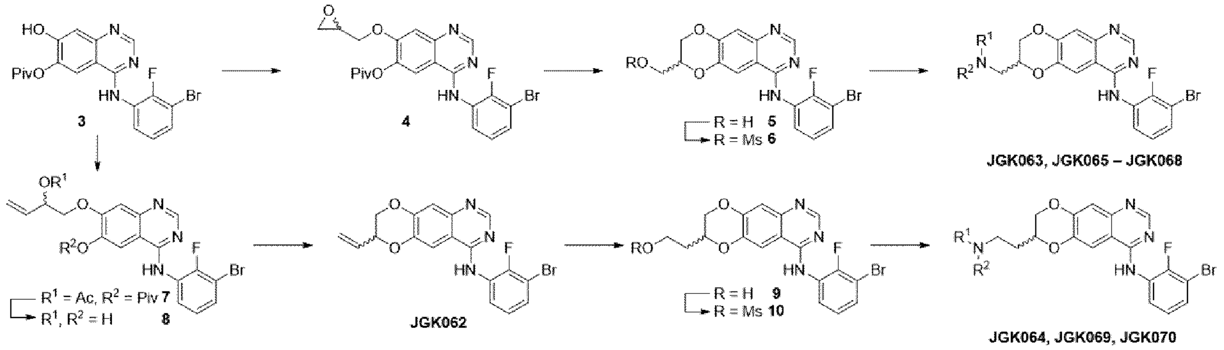


Схема 2. Синтез JGK063 - JGK070.

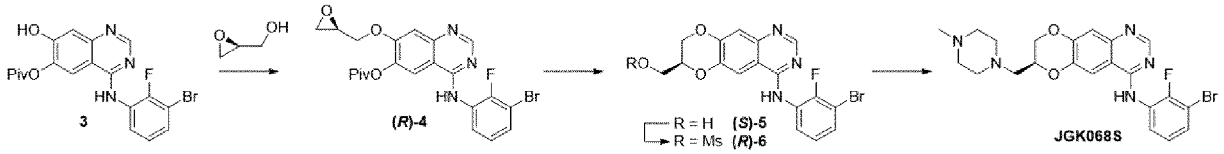


Схема 3. Синтез **JGK068S** ((*S*)-**JGK068**). Синтез выполняли аналогичным образом, как для рацемического образца **JGK068** ((±)-**JGK068**), но с энантиомерно чистым (*S*)-(-)-глицидолом. Другой энантиомер **JGK068R** ((*R*)-**JGK068**) получали с использованием (*R*)-(+)-глицидола (не показан).

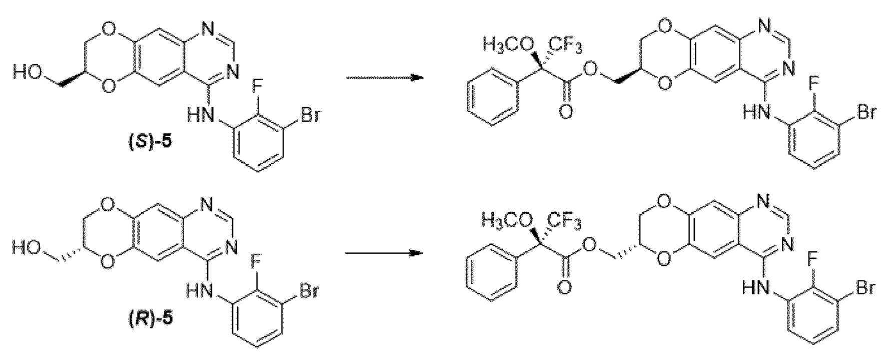


Схема 4. Энантиомерную чистоту синтетического промежуточного соединения **5** определяли с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH) и путем сравнения спектров ^{19}F ЯМР производных эфира Мошера **5** (фиг. 39).

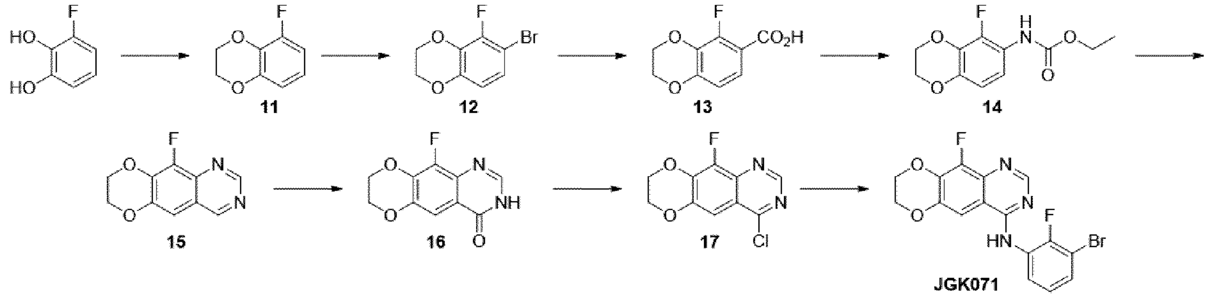


Схема 5. Синтез **JGK071**.

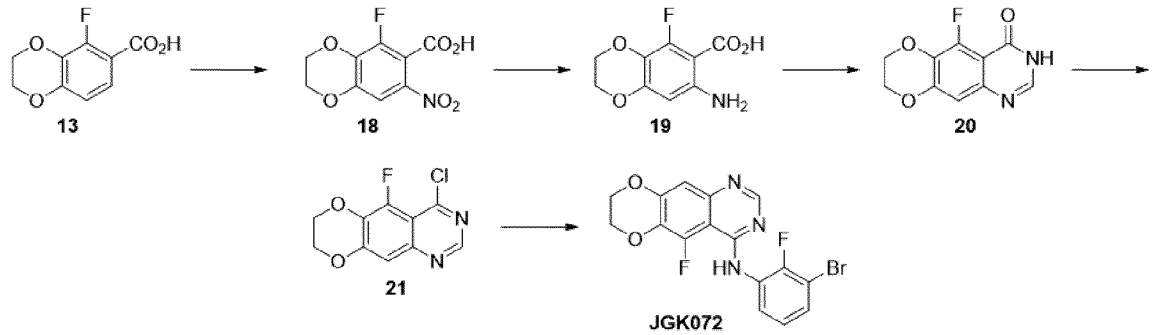


Схема 6. Синтез **JGK072**.

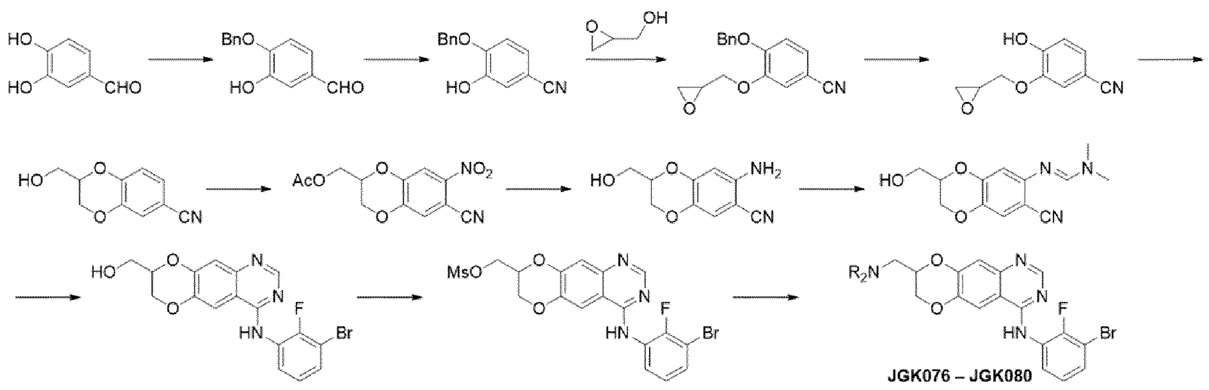


Схема 7. Синтез **JGK076 - JGK080**.

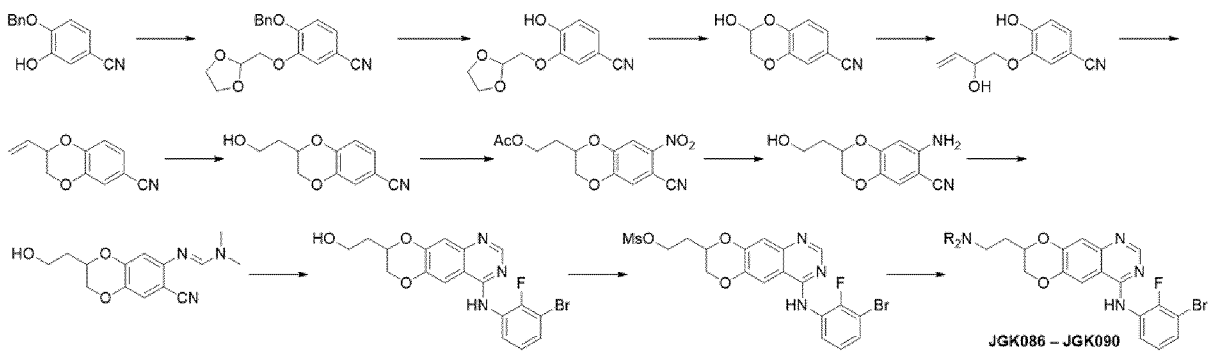


Схема 8. Синтез **JGK086-JGK090**.

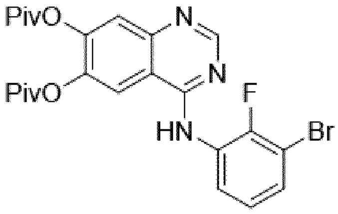
Общая химическая информация

Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Реакции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора CEM Discover. Реакции при комнатной температуре (к. т.) проводили при температуре окружающей среды (приблизительно 23°С). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60 F_{254} с пятнами, визуализированными УФ-светом (λ=254, 365 нм) или с использованием щелочного раствора $KMnO_4$. Колоночную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на SiO_2 60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Препаративную тонкослойную хроматографию (ПТСХ) проводили с пластинами силикагеля Merck 60 F254 (20×20 см, 210-270 мм) или пластинами для ТСХ Analtech Silica Gel GF (20×20 см, 1000 мм). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при 23-50°С. Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса (^{1}H ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода (^{13}C ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР (δ ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные ^{1}H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm; множественность (s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, quint=квинтет, m=мультиплет/смешанный тип, td=триплет дублетов, ddd=дублет дублетов дублетов, br=широкий сигнал); постоянные взаимодействия (J) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР ^{13}C представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействия. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART или на масс-спектрометре Waters LCT Premier с ACQUITY UPLC с автопробоотборником.

Общие процедуры (GP). *GP-1. Нуклеофильное замещение хиназолинилмезилатов вторичными аминами.* Смесь хиназолинилмезилата (1 экв.) в DMF (0,05 M) обрабатывали с помощью вторичного амина (5 экв.) и триэтиламина (2 экв.) и смесь перемешивали при 85°C в течение 24 ч. Смесь охлаждали до 23°C и выпаривали. Остаток растворяли в EtOAc (20 мл), промывали с помощью 10 мМ NaOH (4×5 мл), солевым раствором (5 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ или ПТСХ обеспечивала получение необходимых продуктов обычно в виде грязно-белых рыхлых пен.

GP-2. Нуклеофильное ароматическое замещение 4-хлорхиназолина анилинами. Смесь 4-хлорхиназолина (1 экв.) в ацетонитриле (0,1 M) обрабатывали с помощью анилина (2 экв.) и 4 M раствора HCl в диоксане (1 экв.). Смесь нагревали при 80°C в условиях микроволнового излучения в течение 30 мин. Смесь концентрировали при пониженном давлении или осажденную соль 4-анилинохиназолина гидрохлорида выделяли фильтрацией (промывки с помощью Et_2O). Остаток суспендировали в насыщ. водн. растворе $NaHCO_3$ и экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (3x). Объединенные органические экстракты промывали водой, солевым раствором, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали. Очистка посредством ФХ (элюирование градиентом CH_2Cl_2/EtOAc или гексаны/EtOAc) обеспечивала получение необходимых продуктов, обычно в виде от белого до грязно-белого или бледно-желтого твердых веществ.

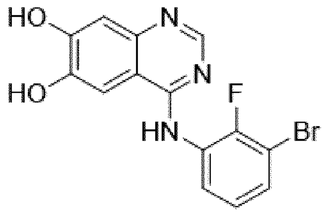
*4-(3-Бром-2-фторанилино)хиназолин-6,7-диил-бис(2,2-диметилпропаноат) (**1**).*



Смесь 4-хлорхиназолин-6,7-диил-бис(2,2-диметилпропаноат) [1] (41,08 г, 113 ммоль) в *i*PrOH (450 мл) обрабатывали с помощью 3-бром-2-фторанилина (17,05 мл, 152 ммоль) и перемешивали при 80°C в течение 3,5 ч. Смесь охлаждали до 23°C и выпаривали. Остаток несколько раз суспендировали в гексанах (50 мл) и концентрировали и затем высушивали под высоким вакуумом. Остаток повторно кристаллизовали из EtOH с получением желтого твердого вещества, которое суспендировали в насыщ. водн. растворе $NaHCO_3$ (1 л) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×550 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (400 мл), солевым раствором (400 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения **1** (35,057 г, 60%) в виде желтой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,76 (с, 1H), 8,46 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,72 (с, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,56 (уш, 1H), 7,32 (ддд, J=8,0, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 1,40 (с, 9H), 1,39 м.д. (с, 9H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=176,13, 175,55, 156,71, 154,96, 150,69 (д, J_{CF}=243,7 Гц), 148,75, 147,83, 142,45, 128,27, 127,86 (д, J_{CF}=10,8 Гц), 125,29 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 122,70, 122,51, 114,43, 113,21, 108,84 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 39,54, 39,51, 27,40, 27,32 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{24}H_{26}BrFN_3O_4^+$, 518,1085; обнаружено 518,1072.

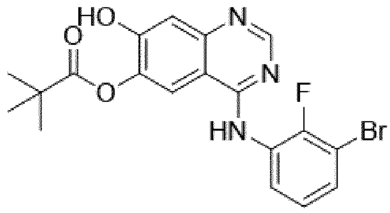
*4-(3-Бром-2-фторанилино)хиназолин-6,7-диол (**2**).*



Перемешиваемую взвесь **1** (34,988 г, 67,5 ммоль) обрабатывали при 0°C с помощью 7 М раствора NH_3 в MeOH (241 мл, 1,69 моль). Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин. и затем при 23°C в течение 4,5 ч. Смесь выпаривали и остаток суспендировали в воде (400 мл), перемешивали в течение ночи и фильтровали. Остаток промывали водой (500 мл), ацетонитрилом (100 мл), ДХМ (4×150 мл), Et_2O (2×150 мл) и сушили в осушителе с получением указанного в заголовке соединения **2** (23,68 г, колич.) в виде бледно-желтого порошка.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=8,18 (с, 1H), 7,59-7,47 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,16 (т, J=8,0 Гц, 1H), 6,87 м.д. (с, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=156,43, 156,12, 153,06 (д, J_{CF}=246,7 Гц), 151,34, 148,39, 146,80, 129,23, 129,01, 127,12, 125,23 (д, J_{CF}=4,3 Гц), 108,47, 108,32, 107,09, 103,04 м.д. МСВР (DART): m/z [M+H]$^+$ рассч. для $C_{14}H_{10}BrFN_3O_2^+$, 349,9935; обнаружено 349,9923.

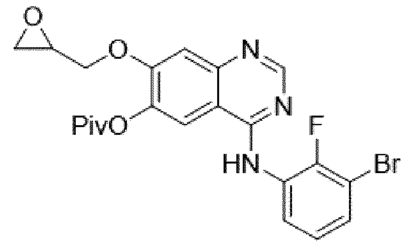
*4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-гидроксихиназолин-6-ил-2,2-диметилпропаноат (**3**).*



Перемешиваемая суспензия **2** (3500 мг, 10,0 ммоль) в DMF (52,6 мл) обрабатывали с помощью Et_3N (5,57 мл, 40,0 ммоль), охлаждали до -40°C и по каплям обрабатывали с помощью Piv_2O (3,14 мл, 15,5 ммоль). Смесь перемешивали при -40°C в течение 1 ч., после чего охлаждающую баню удаляли и перемешивание продолжали в течение 2,5 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью ДХМ (500 мл), промывали 10% уксусной кислотой (2×50 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:1 → 0:1) обеспечивала получение твердого вещества, которое повторно растворяли в EtOAc (750 мл) и промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора NH_4Cl (4×75 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения **3** (2,844 г, 66%) в виде бежево-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=11,00 (уш, 1H), 9,70 (с, 1H), 8,39 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,53 (ддд, J=8,3, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 1,36 м.д. (с, 9H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=175,93, 157,68, 154,61, 154,53, 153,34 (д, J_{CF}=247,3 Гц), 149,80, 139,65, 130,14, 127,92 (д, J_{CF}=12,9 Гц), 127,62, 125,47 (д, J_{CF}=4,4 Гц), 116,36, 111,00, 108,55 (д, J=20,0 Гц), 107,77, 38,64, 26,93 м.д. МСВР (DART): m/z [M+H]$^+$ рассч. для $C_{19}H_{18}BrFN_3O_3^+$, 434,0510; обнаружено 434,0489.

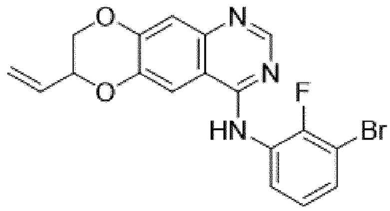
*(±)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-[(оксиран-2-ил)метокси]хиназолин-6-ил-2,2-диметилпропаноат ((±)-**4**).*



Смесь **3** (1350 мг, 3,11 ммоль) и PPh_3 (2038 мг, 7,77 ммоль) в ТГФ (21 мл) обрабатывали с помощью глицидола (495 мкл, 7,46 ммоль), охлаждали до 0°C и обрабатывали с помощью DIAD (1,47 мл, 7,46 ммоль) в течение 10 мин. Смесь перемешивали при 23°C в течение 2,5 ч. и концентрировали. ФХ (ДХМ/EtOAc 9:1 → 4:6) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-**4** (848 мг, 56%) в виде грязно-белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,73 (с, 1H), 8,54 (ддд, J=8,6, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (с, 1H), 7,45 (уш, 1H), 7,30 (ддд, J=8,2, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,34 (дд, J=10,8, 3,0 Гц, 1H), 3,99 (дд, J=10,8, 6,2 Гц, 1H), 3,35 (ддт, J=6,2, 4,1, 2,8 Гц, 1H), 2,92 (дд, J=4,8, 4,1 Гц, 1H), 2,74 (дд, J=4,8, 2,6 Гц, 1H), 1,45 м.д. (с, 9H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=176,87, 156,46, 155,10, 154,93, 150,41 (д, J_{CF}=243,3 Гц), 150,27, 140,99, 128,25 (д, J_{CF}=10,5 Гц), 127,75, 125,28 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 122,22, 114,02, 109,72, 109,49, 108,74 (д, J_{CF}=19,1 Гц), 70,05, 49,55, 44,56, 39,45, 27,38 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{22}BrFN_3O_4^+$, 490,0772; обнаружено 490,0764.

*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-этенил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK062**).*

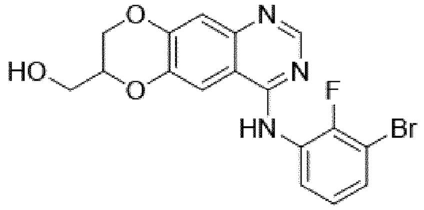


Раствор PPh_3 (832 мг, 3,17 ммоль) и DIAD (624 мкл, 3,17 ммоль) в ТГФ (23 мл) перемешивали при 0°C в течение 15 мин., и затем по каплям добавляли в раствор (±)-**8** (1149 мг, 2,73 ммоль) в ТГФ (27 мл) в течение 10 мин. при 0°C. Смесь перемешивали при 0° в течение 2 ч. и выпаривали. ФХ (гексаны/EtOAc 9:1 → 4:6) с последующей другой ФХ (ДХМ/EtOAc 1:0 → 6:4) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-**JGK062** (1115 мг, колич.) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд, J=8,2, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,27 (ддд, J=8,0, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,10 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 5,95 (ддд, J=17,3, 10,7, 5,8 Гц, 1H), 5,60 (дт, J=17,3, 1,2 Гц, 1H), 5,48 (дт, J=10,7, 1,1 Гц, 1H), 4,82-4,74 (м, 1H), 4,42 (дд, J=11,5, 2,5 Гц, 1H), 4,09 м.д. (дд, J=11,6, 8,1 Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,90, 153,38, 150,14 (д, J=242,4 Гц), 149,12, 146,70, 144,12, 131,48, 128,64 (д, J=10,3 Гц), 127,24, 125,30 (д, J=4,7 Гц), 121,76, 120,43, 114,29, 110,69, 108,58 (д,

J=19,3 Гц), 106,06, 74,03, 67,84 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{14}BrFN_3O_2^+$, 402,0248; обнаружено 402,0233.

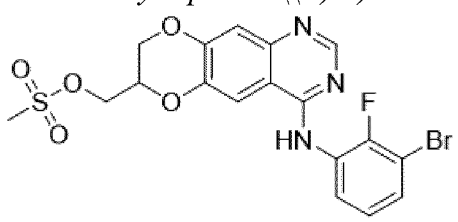
*(±)-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метанол ((±)-**5**).*



Смесь (±)-**4** (842 мг, 1,72 ммоль) в MeOH (31 мл) обрабатывали с помощью K_2CO_3 (482 мг, 3,49 ммоль), перемешивали при 23°C в течение 10,5 ч. и концентрировали. Остаток суспендировали в полунасыщ. водн. растворе NH_4Cl (130 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×20 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (20 мл), солевым раствором (20 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (±)-**5** (720 мг, колич.) в виде желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,59 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,55 (ддд, J=8,4, 7,0, 1,6 Гц, 1H), 7,24-7,18 (м, 1H), 7,21 (с, 1H), 5,16 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,49 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,34 (дтд, J=7,6, 5,2, 2,3 Гц, 1H), 4,21 (дд, J=11,5, 7,4 Гц, 1H), 3,76-3,64 м.д. (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=157,20, 153,35 (д, J_{CF}=247,5 Гц), 153,10, 148,88, 145,95, 143,39, 130,11, 128,05 (д, J_{CF}=13,0 Гц), 127,73, 125,44 (д, J_{CF}=4,4 Гц), 112,33, 109,79, 108,56 (д, J_{CF}=20,0 Гц), 108,37, 73,78, 65,50, 59,78 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{17}H_{14}BrFN_3O_3^+$, 406,0197; обнаружено 406,0185.

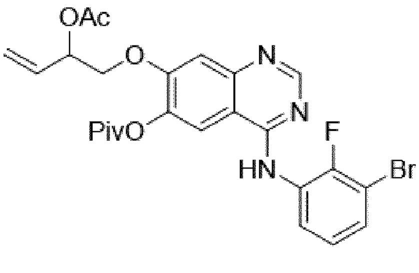
*(±)-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метилметансульфонат ((±)-**6**).*



Раствор (±)-**5** (688 мг, 1,69 ммоль) в ТГФ (14 мл) обрабатывали с помощью Et_3N (357 мкл, 2,56 ммоль), охлаждали до 0°C и по каплям обрабатывали с помощью MsCl (174 мкл, 2,24 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 16 ч., охлаждали до 0°C, обрабатывали насыщ. водн. раствором $NaHCO_3$ (120 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×120 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (100 мл), солевым раствором (100 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. ФХ (ДХМ/EtOAc 8:2 → 3:7) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-**6** (496 мг, 61%) в виде грязно-белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,69 (с, 1H), 8,60 (ддд, J=8,5, 7,2, 1,4 Гц, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,39 (уш, 1H), 7,37 (с, 1H), 7,29 (ддд, J=8,1, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,63 (дтд, J=7,2, 4,9, 2,5 Гц, 1H), 4,52 (дд, J=4,9, 0,9 Гц, 2H), 4,49 (дд, J=11,8, 2,5 Гц, 1H), 4,29 (дд, J=11,8, 7,1 Гц, 1H), 3,13 м.д. (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=156,02, 153,66, 150,28 (д, J_{CF}=242,9 Гц), 148,65, 146,80, 143,09, 128,43 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,54, 125,32 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 122,01, 114,77, 110,90, 108,66 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 106,44, 71,10, 66,46, 64,77, 38,02 м.д. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{15}BrFN_3O_5S^+$, 483,9973; обнаружено 483,9950.

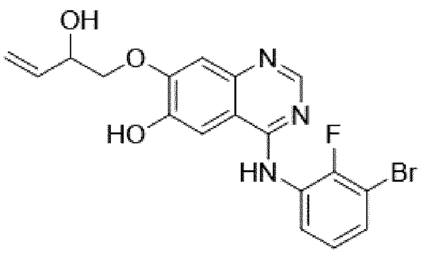
*(±)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-{[2-(ацетокси)бут-3-ен-1-ил]окси}хиназолин-6-ил-2,2-диметилпропаноат ((±)-**7**).*



Смесь **3** (2639 мг, 6,08 ммоль) и PPh_3 (3986 мг, 15,2 ммоль) в ТГФ (41 мл) обрабатывали с помощью рацемического 1-гидроксибут-3-ен-2-илацетата [2] (1,7 мл, 13,7 ммоль), охлаждали до 0°C и по каплям обрабатывали с помощью DIAD (2,7 мл, 13,7 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 3 ч. и концентрировали. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:0 → 6:4) обеспечивала получение неочищенного (±)-**7** (5,508 г, оцененный выход 60%) в виде грязно-белого твердого вещества, которое загрязняли остатком Ph_3PO. Материал использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ=8,74 (с, 1H), 8,53 (т, J=7,9 Гц, 1H), 7,53 (с, 1H), 7,45 (уш, 1H), 7,33 (с, 1H), 7,30 (т, J=7,7 Гц, 1H), 7,11 (т, J=8,0 Гц, 1H), 5,90 (ддд, J=17,0, 10,6, 6,2 Гц, 1H), 5,65 (q, J=6,0 Гц, 1H), 5,49-5,29 (м, 2H), 4,31-4,08 (м, 2H), 2,11 (с, 3H), 1,41 м.д. (с, 9H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=176,51, 170,08, 156,49, 155,24, 154,88, 150,46 (д, J_{CF}=243,2 Гц), 150,17, 140,90, 132,16, 128,18 (д, J_{CF}=11,0 Гц), 127,86, 125,31 (д, J_{CF}=4,8 Гц), 122,27, 119,64, 114,00, 109,56, 109,39, 108,76 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 72,18, 69,81, 39,34, 27,33, 21,19 м.д. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{25}H_{26}BrFN_3O_5^+$, 546,1034; обнаружено 546,1018.

*(±)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-[(2-гидроксибут-3-ен-1-ил)окси]хиназолин-6-ол ((±)-**8**).*

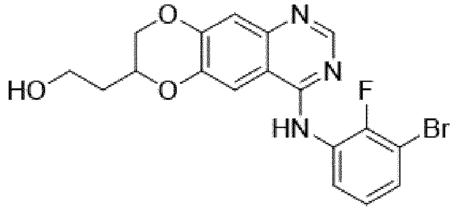


Смесь неочищенного (±)-**7** (5508 мг, загрязненного остатком Ph3PO с последней стадии) в MeOH (61 мл) обрабатывали с помощью K_2CO_3 (4198 мг, 30,4 ммоль), перемешивали при 23°C в течение 1 ч. и концентрировали. Остаток суспендировали в полунасыщ. водн. растворе NH_4Cl (1 л) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×600 мл). Объединенные органические вещества сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:1 → 0:1) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-**8**

(1154 мг, 45% с двух стадий) в виде грязно-белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,46 (с, 1H), 9,40 (уш, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,71 (с, 1H), 7,59-7,52 (м, 2H), 7,203 (с), 7,197 (тд, J=8,1, 1,1 Гц, 1H), 6,01 (ддд, J=17,4, 10,7, 4,9 Гц, 1H), 5,42 (дт, J=17,3, 1,9 Гц, 1H), 5,36 (уш, 1H), 5,20 (дт, J=10,6, 1,8 Гц, 1H), 4,49 (уш, 1H), 4,20 (дд, J=9,8, 3,8 Гц, 1H), 3,95 м.д. (дд, J=9,8, 7,5 Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=156,77, 153,30 (д, J_{CF}=244,9 Гц), 152,77, 152,31, 146,66, 146,11, 137,61, 129,75, 128,46 (д, J_{CF}=13,0 Гц), 127,49, 125,38 (д, J_{CF}=4,3 Гц), 115,58, 109,42, 108,50 (д, J_{CF}=19,8 Гц), 107,68, 105,14, 72,56, 69,26 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{16}BrFN_3O_3^+$, 420,0354; обнаружено 420,0340.

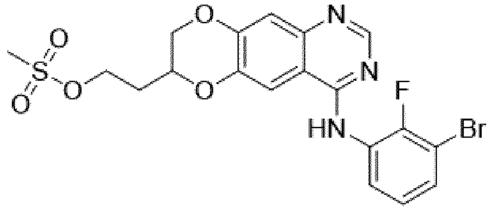
*(±)-2-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]этан-1-ол ((±)-**9**).*



Смесь (±)-**JGK062** (480 мг, 1,19 ммоль) в ТГФ (4,8 мл) обрабатывали с помощью 0,5 М раствора 9-BBN в ТГФ (4,8 мл, 2,39 ммоль) и смесь перемешивали при 68°С в течение 16 ч. Смесь охлаждали до 0°С, разбавляли с помощью ТГФ (2,4 мл) и обрабатывали с помощью 3 н. NaOH (3 мл, 8,95 ммоль) и 30% H_2O_2 (474 мкл, 8,95 ммоль) и перемешивали при 23°С в течение 6 ч. Смесь концентрировали до около половины исходного объема ТГФ, разбавляли водой (100 мл) и солевым раствором (40 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×100 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (70 мл), солевым раствором (70 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения (±)-**9** (912 мг) в виде желтой пены, которую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,66 (с, 1H), 8,62 (ддд, J=8,8, 7,4, 1,6 Гц, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,33 (уш, 1H), 7,2 (ддд, J=8,0, 6,5, 1,6 Гц, 1H), 7,16 (с, 1H), 7,09 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,50 (дтд, J=8,4, 6,4, 2,3 Гц, 1H), 4,43 (дд, J=11,5, 2,3 Гц, 1H), 4,09 (дд, J=11,5, 8,2 Гц, 1H), 4,01-3,91 (м, 2H), 1,95 м.д. (тд, J=6,5, 5,3 Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,84, 153,28, 150,08 (д, J_{CF}=242,6 Гц), 149,42, 146,47, 144,20, 128,51 (д, J_{CF}=10,2 Гц), 127,31, 125,30 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,69, 113,95, 110,50, 108,58 (д, J_{CF}=19,2 Гц), 105,83, 71,33, 68,49, 58,23, 33,61 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{16}BrFN_3O_3^+$, 420,0354; обнаружено 420,0370.

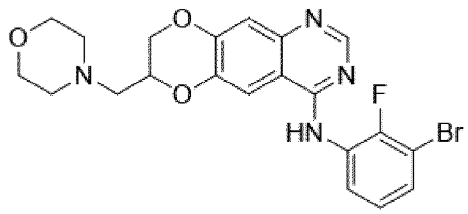
*(±)-2-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]этилметансульфонат ((±)-**10**).*



Раствор неочищенного (±)-**9** (912 мг) в ТГФ (11,9 мл) обрабатывали с помощью Et_3N (931 мл, 6,68 ммоль), охлаждали до 0°С и по каплям обрабатывали с помощью MsCl (462 мкл, 5,97 ммоль). Смесь перемешивали при 0°С в течение 15 мин. и затем при 23°С в течение 21 ч. Смесь охлаждали до 0 °С, по каплям обрабатывали с помощью насыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (120 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×120 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (100 мл), солевым раствором (100 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. ФХ (ДХМ/EtOAc 9:1 → 4:6) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-**10** (112 мг, 19% с двух стадий) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,60 (ддд, J=8,6, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,44 (уш, 1H), 7,42 (с, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,29 (ддд, J=8,1, 6,5, 1,6 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,60-4,48 (м, 3H), 4,44 (дд, J=11,6, 2,4 Гц, 1H), 4,12 (дд, J=11,6, 7,6 Гц, 1H), 3,08 (с, 3H), 2,24-2,10 м.д. (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=156,03, 153,39, 150,31 (д, J_{CF}=242,9 Гц), 149,11, 146,54, 143,60, 128,47 (д, J_{CF}=10,5 Гц), 127,52, 125,32 (д, J_{CF}=4,6 Гц), 122,02, 114,30, 110,68, 108,66 (д, J_{CF}=19,2 Гц), 106,32, 69,78, 67,82, 65,05, 37,75, 30,90 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{19}H_{18}BrFN_3O_5S^+$, 498,0129; обнаружено 498,0144.

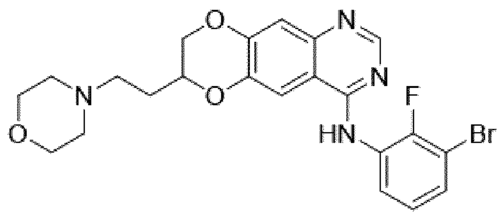
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(морфолин-4-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK063**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK063** получали из (±)-**6** (20 мг, 0,04 ммоль) и морфолина (18 мкл, 0,21 ммоль) в DMF (826 мкл). ПТСХ (ДХМ/EtOAc 1:9) обеспечивала получение (±)-**JGK063** (15 мг, 76%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,67 (с, 1H), 8,63 (ддд, J=8,6, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,31 (с, 1H), 7,27 (ддд, J=8,0, 6,3, 1,5 Гц, 1H), 7,10 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,50-4,41 (м, 2H), 4,21-4,12 (м, 1H), 3,75 (т, J=4,7 Гц, 4H), 2,77 (дд, J=13,4, 5,9 Гц, 1H), 2,69-2,54 м.д. (м, 5H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,89, 153,36, 150,15 (д, J_{CF}=242,5 Гц), 149,35, 146,66, 144,02, 128,60 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,27, 125,30 (д, J_{CF}=4,6 Гц), 121,80, 114,29, 110,63, 108,58 (д, J_{CF}=19,5 Гц), 106,06, 71,61, 67,18, 67,01, 58,94, 54,56 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M - H]^-$ рассч. для $C_{21}H_{19}BrFN_4O_3^-$, 473,0630; обнаружено 473,0630.

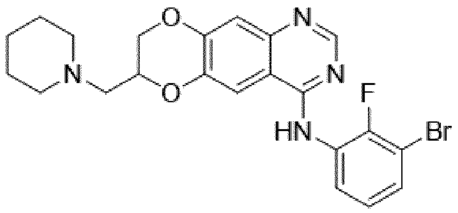
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(морфолин-4-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK064**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK064** получали из (±)-**10** (35 мг, 0,07 ммоль) и морфолина (31 мкл, 0,35 ммоль) в DMF (1,4 мл). ПТСХ (EtOAc, 0,5% ацетонитрил, 1,5% водн. раствор NH_4OH) с последующей другой ПТСХ (EtOAc) обеспечивала получение (±)-**JGK064** (25 мг, 73%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд, J=8,3, 7,4, 1,5 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,30-7,25 (м, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,44 (дд, J=11,3, 2,3 Гц, 1H), 4,43-4,37 (м, 1H), 4,10 (дд, J=11,3, 7,7 Гц, 1H), 3,73 (т, J=4,7 Гц, 4H), 2,62 (ддт, J=12,5, 8,4, 3,9 Гц, 2H), 2,57-2,42 (м, 4H), 2,00-1,82 м.д. (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,86, 153,31, 150,13 (д, J_{CF}=242,3 Гц), 149,40, 146,67, 144,33, 128,66 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,22, 125,33 (д, J_{CF}=4,6 Гц), 121,75, 114,21, 110,63, 108,58 (д, J_{CF}=19,2 Гц), 105,87, 72,20, 68,33, 67,06, 54,23, 53,86, 28,15 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{23}BrFN_4O_3^+$, 489,0932; обнаружено 489,0935.

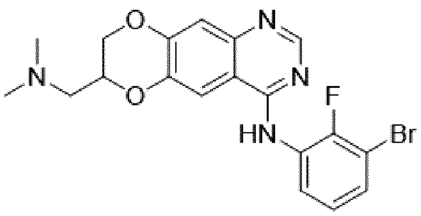
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(пиперидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK065**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK065** получали из (±)-**6** (40 мг, 0,08 ммоль) и пиперидина (41 мкл, 0,41 ммоль) в DMF (1,65 мл). ПТСХ (EtOAc) обеспечивала получение (±)-**JGK065** (24 мг, 61%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,66 (с, 1H), 8,63 (ддд, J=8,7, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,369 (с, 1H), 7,368 (уш, 1H), 7,30 (с, 1H), 7,26 (ддд, J=8,1, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,09 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,46 (дд, J=11,3, 2,3 Гц, 1H), 4,43 (ддд, J=8,3, 5,8, 2,0 Гц, 1H), 4,12 (дд, J=11,2, 7,5 Гц, 1H), 2,71 (дд, J=13,3, 5,9 Гц, 1H), 2,58 (дд, J=13,4, 6,2 Гц, 1H), 2,59-2,42 (м, 4H), 1,65-1,57 (м, 4H), 1,49-1,41 м.д. (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,86, 153,26, 150,12 (д, J_{CF}=242,6 Гц), 149,49, 146,62, 144,23, 128,65 (д, J_{CF}=10,3 Гц), 127,18, 125,27 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 121,76, 114,16, 110,57, 108,56 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 106,00, 71,87, 67,46, 59,34, 55,59, 26,07, 24,20 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{23}BrFN_4O_2^+$, 473,0983; обнаружено 473,0991.

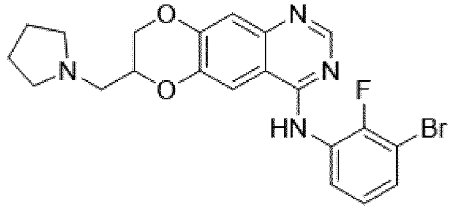
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(диметиламино)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK066**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK066** получали из (±)-**6** (45 мг, 0,09 ммоль) и 2 М раствора Me_2NH в ТГФ (232 мкл, 0,46 ммоль) в DMF (1,85 мл). ПТСХ (EtOAc, 0,5% ацетонитрил, 1,5% водн. раствор NH_4OH) обеспечивала получение (±)-**JGK066** (39 мг, 97%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,680 (с, 1H), 8,675 (ддд, J=8,2, 7,5, 1,5 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,27 (ддд, J=8,0, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,10 (д, J=1,6 Гц, 1H), 4,46-4,41 (м, 1H), 4,45 (дд, J=11,8, 2,3 Гц, 1H), 4,12 (дд, J=11,9, 8,1 Гц, 1H), 2,73 (дд, J=13,2, 7,1 Гц, 1H), 2,55 (дд, J=13,1, 5,0 Гц, 1H), 2,38 м.д. (с, 6H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,89, 153,34, 150,07 (д, J_{CF}=242,3 Гц), 149,38, 146,67, 144,06, 128,70 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,16, 125,29 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,65, 114,27, 110,67, 108,56 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 106,15, 71,70, 67,20, 59,78, 46,41 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{19}H_{19}BrFN_4O_2^+$, 433,0670; обнаружено 433,0677.

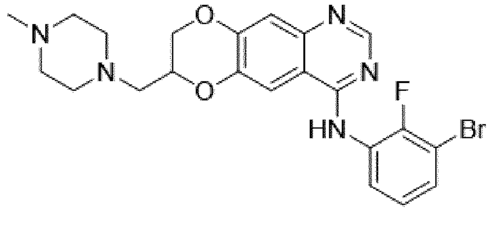
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(пирролидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK067**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK067** получали из (±)-**6** (35 мг, 0,07 ммоль) и пирролидина (30 мкл, 0,36 ммоль) в DMF (1,45 мл). ПТСХ (EtOAc, 1,5% *i*PrOH, 1,5% водн. раствор NH_4OH) обеспечивала получение (±)-**JGK067** (31 мг, 93%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,67 (ддд, J=8,7, 7,5, 1,6 Гц, 2H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (уш, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,27 (ддд, J=8,0, 6,4, 1,5 Гц, 2H), 7,10 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,49-4,42 (м, 1H), 4,48 (дд, J=11,6, 2,0 Гц, 1H), 4,15 (дд, J=11,7, 8,0 Гц, 1H), 2,88 (дд, J=12,9, 6,5 Гц, 1H), 2,80 (дд, J=12,6, 5,5 Гц, 1H), 2,72-2,60 (м, 4H), 1,90-1,79 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,87, 153,32, 150,09 (д, J_{CF}=242,6 Гц), 149,45, 146,68, 144,18, 128,71 (д, J_{CF}=10,3 Гц), 127,15, 125,30 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,67, 114,26, 110,65, 108,56 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 106,06, 72,73, 67,35, 56,57, 55,15, 23,75 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{21}H_{21}BrFN_4O_2^+$, 459,0826; обнаружено 459,0845.

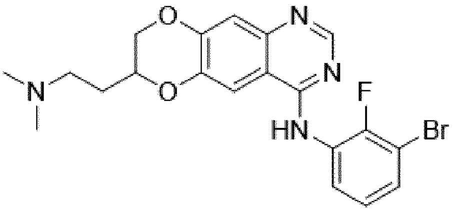
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK068**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK068** получали из (±)-**6** (35 мг, 0,07 ммоль) и 1-метилпиперазина (40 мкл, 0,36 ммоль) в DMF (1,45 мл). ПТСХ (EtOAc/*i*PrOH 85:15, 1,5% водн. раствор NH_4OH) обеспечивала получение (±)-**JGK068** (29 мг, 82%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,68 (с, 1H), 8,64 (ддд, J=8,3, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (уш д, *J*=3,8 Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,27 (ддд, *J*=8,0, 6,5, 1,6 Гц, 1H), 7,10 (тд, *J*=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,48-4,41 (м, 2H), 4,15 (дд, *J*=11,5, 8,6 Гц, 1H), 2,78 (дд, *J*=13,4, 6,0 Гц, 1H), 2,661 (дд, *J*=13,4, 5,8 Гц, 1H), 2,656 (уш, 4H), 2,51 (уш, 4H), 2,32 м.д. (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,89, 153,35, 150,15 (д, J_{CF}=242,6 Гц), 149,40, 146,69, 144,11, 128,64 (д, J_{CF}=10,3 Гц), 127,24, 125,30 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,78, 114,27, 110,63, 108,59 (д, J_{CF}=19,2 Гц), 106,07, 71,80, 67,27, 58,43, 55,10, 53,96, 46,06 м.д. МСВР (ИЭР): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{24}BrFN_5O_2^+$, 488,1092; обнаружено 488,1109.

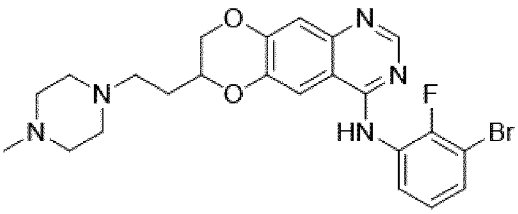
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(диметиламино)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK069**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK069** получали из (±)-**10** (32 мг, 0,06 ммоль) и 2 М раствора Me_2NH в ТГФ (161 мкл, 0,32 ммоль) в DMF (1,3 мл). ПТСХ (EtOAc, 5% *i*PrOH, 1,5% водн. раствор NH_4OH) обеспечивала получение (±)-**JGK069** (19 мг, 66%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,67 (с, 1H), 8,63 (ддд, *J*=8,7, 7,4, 1,6 Гц, 1H), 7,373 (уш, 1H), 7,371 (с, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,28-7,24 (м, 1H), 7,10 (тд, *J*=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,42 (дд, *J*=11,4, 2,3 Гц, 1H), 4,38 (тдд, *J*=7,7, 5,1, 2,3 Гц, 1H), 4,08 (дд, *J*=11,3, 7,8 Гц, 1H), 2,56 (т, *J*=7,2 Гц, 2H), 2,29 (с, 6H), 1,93 (дк, *J*=14,2, 7,4 Гц, 1H), 1,84 м.д. (дтд, *J*=14,2, 7,5, 5,1 Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,86, 153,26, 150,14 (д, J_{CF}=242,4 Гц), 149,42, 146,65, 144,36, 128,67 (д, J_{CF}=10,5 Гц), 127,18, 125,30 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,77, 114,14, 110,60, 108,56 (д, J_{CF}=19,2 Гц), 105,88, 72,19, 68,34, 55,06, 45,58, 29,16 м.д. МСВР (ИЭР): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{20}H_{21}BrFN_4O_2^+$, 447,0826; обнаружено 447,0820.

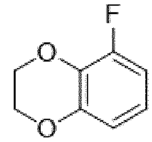
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-**JGK070**).*



После общей процедуры **GP-1** соединение (±)-**JGK070** получали из (±)-**10** (32 мг, 0,06 ммоль) и 1-метилпиперазина (36 мкл, 0,32 ммоль) в DMF (1,3 мл). ПТСХ (EtOAc/*i*PrOH 8:2, 1,5% водн. раствор NH_4OH) обеспечивала получение (±)-**JGK070** (21 мг, 65%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,66 (с, 1H), 8,62 (ддд, *J*=8,5, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,373 (уш, 1H), 7,367 (с, 1H), 7,29-7,24 (м, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,09 (тд, *J*=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,43 (дд, *J*=11,4, 2,3 Гц, 1H), 4,37 (тдд, *J*=7,7, 5,4, 2,3 Гц, 1H), 4,08 (дд, *J*=11,4, 7,9 Гц, 1H), 2,68-2,54 (м, 2H), 2,50 (уш, 8H), 2,30 (с, 3H), 1,94 (дтд, J=13,6, 7,5, 6,0 Гц, 1H), 1,86 м.д. (дтд, J=14,2, 7,3, 5,3 Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,86, 153,27, 150,16 (д, J_{CF}=242,5 Гц), 149,41, 146,64, 144,37, 128,64 (д, J_{CF}=10,3 Гц), 127,22, 125,28 (д, J_{CF}=4,6 Гц), 121,81, 114,13, 110,60, 108,57 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 105,88, 72,38, 68,36, 55,20, 53,77, 53,25, 46,11, 28,50 м.д. МСВР (ИЭР): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{23}H_{26}BrFN_5O_2^+$, 502,1248; обнаружено 502,1261.

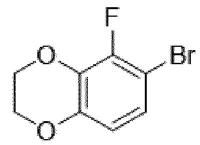
*5-Фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин (**11**).*



Смесь 3-фторбензол-1,2-диола (7233 мг, 56,5 ммоль) в DMF (113 мл) обрабатывали с помощью K_2CO_3 (19514 мг, 141 ммоль), перемешивали в течение 10 мин. при 23°C и обрабатывали с помощью 1-бром-2-хлорэтана (9,4 мл, 113 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч. и затем при 95°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до 23°C, разбавляли водой (150 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (90 мл), солевым раствором (90 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/EtOAc 30:1 → 10:1) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения **11** (7973 мг, 92%) в виде прозрачного бесцветного масла.

^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ=6,78-6,63 (м, 3H), 4,34-4,26 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): δ=152,05 (д, J_{CF}=244,3 Гц), 145,27 (д, J_{CF}=3,8 Гц), 132,78 (д, J_{CF}=13,9 Гц), 120,02 (д, J_{CF}=8,9 Гц), 112,74 (д, J_{CF}=3,1 Гц), 108,52 (д, J_{CF}=18,1 Гц), 64,50, 64,45 м.д. МСВР (DART): m/z $[M]^{\bullet+}$ рассч. для $C_8H_7FO_2^{\bullet+}$, 154,0425; обнаружено 154,0420.

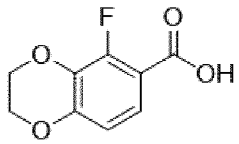
*6-Бром-5-фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин (**12**).*



Раствор **11** (7812 мг, 50,7 ммоль) в MeOH (101 мл) обрабатывали с помощью NBS (9022 мг, 50,7 ммоль) и нагревали при 70°C в течение 30 мин. Смесь охлаждали до 23°C и концентрировали. Остаток растворяли в ДХМ (700 мл), промывали водой (300 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/EtOAc 30:1 → 20:1) с последующей сушкой под высоким вакуумом при 100°C для удаления любого оставшегося исходного материала обеспечивала получение указанного в заголовке соединения **12** (8807 мг, 75%, содержащего около 15% региоизомера) в виде прозрачного бесцветного масла, которое затвердевало в морозилке с получением грязно-белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ=6,96 (дд, J=9,0, 7,0 Гц, 1H), 6,59 (дд, J=9,0, 2,0 Гц, 1H), 4,35-4,24 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): δ=148,87 (д, J_{CF}=245,1 Гц), 144,53 (д, J_{CF}=3,5 Гц), 133,81 (д, J_{CF}=14,6 Гц), 123,31, 113,39 (д, J_{CF}=3,6 Гц), 109,17 (д, J_{CF}=19,3 Гц), 64,51, 64,34 м.д. МСВР (DART): m/z $[M]^{\bullet+}$ рассч. для $C_8H_6BrFO_2^{\bullet+}$, 231,9530; обнаружено 231,9525.

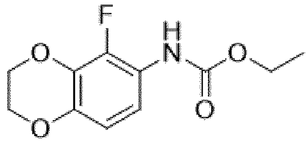
*5-Фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбоновая кислота (**13**).*



Смесь **12** (7,0 г, 30,0 ммоль) в ТГФ (108 мл) охлаждали до -78°C и по каплям обрабатывали с помощью 2,5 М раствора *n*BuLi в гексанах (12,02 мл, 30,0 ммоль) в течение 10 мин. Смесь перемешивали при -78°C в течение 30 мин. и затем переносили посредством канюли на раздробленный сухой лед (промывали канюлю с помощью 10 мл ТГФ). Смеси позволяли нагреться до 23°C и концентрировали. Воду (200 мл) и 1 М NaOH (50 мл) добавляли к остатку и водн. фазу экстрагировали с помощью Et_2O (3×60 мл). Водн. фазу подкисляли с помощью 6 М HCl (15 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×150 мл). Объединенные органические вещества промывали солевым раствором (150 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/EtOAc 7:3 → 3:7) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения **13** (3591 мг, 60%) в виде белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ=12,90 (уш, 1H), 7,33 (дд, J=8,9, 7,7 Гц, 1H), 6,78 (дд, J=8,9, 1,7 Гц, 1H), 4,39-4,29 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, DMSO-d_6): δ=164,65 (д, J_{CF}=3,0 Гц), 151,21 (д, J_{CF}=257,5 Гц), 148,50 (д, J_{CF}=4,4 Гц), 132,68 (д, J_{CF}=13,6 Гц), 122,44 (д, J_{CF}=1,4 Гц), 112,12 (д, J_{CF}=3,4 Гц), 111,97 (д, J_{CF}=7,3 Гц), 64,42, 63,91 м.д. МСВР (DART): *m/z* [M - H]$^-$ рассч. для $C_9H_6FO_4^-$, 197,0256; обнаружено 197,0250.

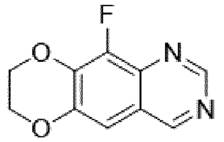
*Этил-(5-фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-ил)карбамат (**14**).*



Смесь **13** (650 мг, 3,28 ммоль) в толуоле (13,1 мл) обрабатывали с помощью Et_3N (1,4 мл, 9,84 ммоль) и при 10°C с помощью DPPA (780 мкл, 3,62 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 30 мин., затем при 85°C в течение 1,5 ч. Смесь охлаждали до 23°C, обрабатывали с помощью EtOH (5 мл), перемешивали в течение 1,5 ч. при 23°C и концентрировали. Остаток растворяли в Et_2O (150 мл), промывали насыщ. водн. раствором $NaHCO_3$ (40 мл), водой (40 мл), солевым раствором (40 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/ДХМ 7:3 → 1:9) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения **14** (512 мг, 65%) в виде белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=7,42 (уш, 1H), 6,64 (дд, J=9,2, 2,2 Гц, 1H), 6,56 (уш, 1H), 4,32-4,24 (м, 4H), 4,22 (q, J=7,1 Гц, 2H), 1,31 м.д. (т, J=7,1 Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=153,80, 142,61 (д, J_{CF}=246,0 Гц), 140,82, 132,66 (д, J_{CF}=12,4 Гц), 120,36 (д, J_{CF}=6,9 Гц), 112,36, 111,81 (д, J_{CF}=3,7 Гц), 64,72, 64,29, 61,61, 14,66 м.д. МСВР (DART): *m/z* [M+H]$^+$ рассч. для $C_{11}H_{13}FNO_4^+$, 242,0823; обнаружено 242,0816.

*10-Фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин (**15**).*

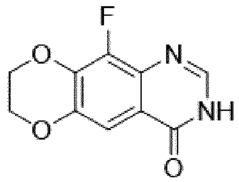


Смесь **14** (450 мг, 1,87 ммоль) и HMTA (263 мг, 1,87 ммоль) в TFA (5,7 мл) подвергали микроволновому излучению при 110°C в течение 10 мин. Смесь охлаждали до 23°C, разбавляли водой (60 мл), обрабатывали с помощью 6 М NaOH (12 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×60 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (50 мл), солевым раствором (50 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением пенистого желтого масла.

Смесь масла в 10% KOH в диоксане/воде 1:1 (15,5 мл) обрабатывали с помощью $[K_3Fe(CN)_6]$ (614 мг, 1,87 ммоль) и подвергали микроволновому излучению при 100°C в течение 10 мин. Эту процедуру повторяли всего четыре раза (4 цикла добавления 1 экв. ферроцианида калия с последующим микроволновым излучением). Полученную смесь разбавляли водой (160 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×120 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (100 мл), солевым раствором (100 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения **15** (330 мг, 86%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=9,21 (уш, 1H), 9,19 (с, 1H), 7,18 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,53-4,41 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=158,06 (д, J_{CF}=2,9 Гц), 153,81 (д, J_{CF}=1,8 Гц), 145,76 (д, J_{CF}=2,9 Гц), 144,40 (д, J_{CF}=256,1 Гц), 138,56 (д, J_{CF}=11,0 Гц), 136,73 (д, J_{CF}=10,1 Гц), 119,81 (д, J_{CF}=2,7 Гц), 106,55 (д, J_{CF}=4,3 Гц), 64,78, 64,34 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_8FN_2O_2^+$, 207,0564; обнаружено 207,0563.

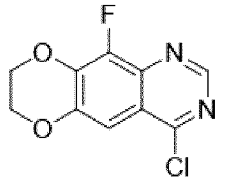
*10-Фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4(3H)-он (**16**).*



Раствор **15** (306 мг, 1,48 ммоль) в AcOH (1 мл) по каплям обрабатывали с помощью 0,833 М раствора CAN в воде (7,12 мл, 5,94 ммоль) и перемешивали при 23°C в течение 15 мин. Белый осадок собирали фильтрацией и промывали водой (2×2 мл), ацетонитрилом (2×2 мл), ДХМ (2 мл) и Et_2O (2 мл) с получением первой партии указанного в заголовке соединения. Водн. фильтрат нейтрализовали до pH ~7 с помощью 1 М NaOH и белы осадок собирали фильтрацией, как и раньше, с последующей промывкой с получением второй партии указанного в заголовке соединения **16** (81 мг, 25%) в виде белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=12,19 (уш, 1H), 7,98 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 4,52-4,28 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=159,31, 144,58 (д, J_{CF}=251,8 Гц), 144,28, 143,80 (д, J_{CF}=3,4 Гц), 137,86 (д, J_{CF}=11,1 Гц), 132,94 (д, J_{CF}=8,9 Гц), 115,75, 106,62 (д, J_{CF}=3,7 Гц), 64,57, 64,02 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_8FN_2O_3^+$, 223,0513; обнаружено 223,0503.

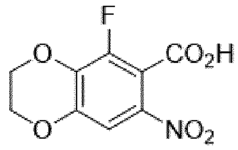
*4-Хлор-10-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин (**17**).*



Перемешиваемую суспензию **16** (92 мг, 0,41 ммоль) в толуоле (1,2 мл) обрабатывали с помощью DIPEA (220 мкл, 1,26 ммоль) с последующим добавлением по каплям $POCl_3$ (103 мкл, 1,12 ммоль) при 10°C. Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч., затем при 90°C в течение 5 ч. и концентрировали. Остаток обрабатывали с помощью насыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (10 мл) при 0°C в течение 5 мин., разбавляли водой (5 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×7 мл). Объединенные органические вещества промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (7 мл), солевым раствором (7 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения **17** (51 мг, 51%) в виде светло-коричневого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,90 (с, 1H), 7,51 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,55-4,43 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=160,48 (д, J_{CF}=4,3 Гц), 152,31, 146,29 (д, J_{CF}=3,3 Гц), 144,63 (д, J_{CF}=256,2 Гц), 138,95 (д, J_{CF}=11,3 Гц), 137,68 (д, J_{CF}=10,2 Гц), 118,56 (д, J_{CF}=2,4 Гц), 105,82 (д, J_{CF}=4,2 Гц), 64,81, 64,41 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_7ClFN_2O_2^+$, 241,0175; обнаружено 241,0174.

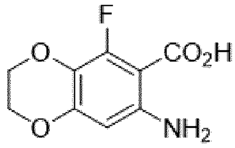
*5-Фтор-7-нитро-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбоновая кислота (**18**).*



Смесь **13** (1500 мг, 7,57 ммоль) в AcOH (7,5 мл) по каплям обрабатывали с помощью H_2SO_4 (2,02 мл) при 10°C. Тщательно перемешанную смесь по каплям обрабатывали с помощью 65% HNO_3 (2,6 мл) при 0°C в течение 10 мин. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин. и затем при 23°C в течение 16 ч. Смесь выливали в ледяную воду (40 мл) и белый осадок собирали фильтрацией (промывки холодной водой, 40 мл) и сушили в осушителе с получением указанного в заголовке соединения **18** (1280 мг, 70%) в виде белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=14,09 (уш, 1H), 7,62 (д, J=1,7 Гц, 1H), 4,52-4,40 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=162,71, 147,16 (д, J_{CF}=248,7 Гц), 144,72 (д, J_{CF}=5,1 Гц), 138,15 (д, J_{CF}=13,7 Гц), 137,10 (д, J_{CF}=6,6 Гц), 113,44 (д, J_{CF}=20,3 Гц), 109,52 (д, J_{CF}=2,3 Гц), 64,97, 64,48 м.д. МСВР (DART): m/z $[M - H]^-$ рассч. для $C_9H_5FNO_6^-$, 242,0106; обнаружено 242,0124.

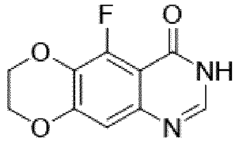
*7-Амино-5-фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбоновая кислота (**19**).*



Смесь **18** (500 мг, 2,06 ммоль) и 5% Pd/C (223 мг, 0,10 ммоль) в MeOH (21 мл) перемешивали в атмосфере H_2 при 23°C в течение 13,5 ч. Смесь фильтровали через целит (промывки с помощью EtOH) и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения **19** (418 мг, 95%) в виде серого твердого вещества, которое не выглядело очень стабильным.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=8,35 (уш, 2H), 6,04 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,29-4,24 (м, 2H), 4,19-4,14 м.д. (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=167,36 (д, J_{CF}=2,9 Гц), 151,36 (д, J_{CF}=252,0 Гц), 148,86 (д, J_{CF}=7,0 Гц), 145,81 (д, J_{CF}=5,7 Гц), 122,88 (д, J_{CF}=15,4 Гц), 97,19 (д, J_{CF}=2,9 Гц), 95,37 (д, J_{CF}=10,9 Гц), 64,95, 63,58 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_9H_9FNO_4^+$, 214,0510; обнаружено 214,0508.

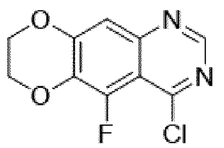
*5-Фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4(3H)-он (**20**).*



Смесь **19** (417 мг, 1,96 ммоль) в формамиде (2,3 мл, 58,7 ммоль) перемешивали при 120-125°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до 0°C и обрабатывали с помощью воды (4 мл), перемешивали в течение 30 мин., разбавляли водой (4 мл) и фильтровали. Остаток промывали холодной водой (3×5 мл) и сушили над Drierite под высоким вакуумом с получением указанного в заголовке соединения **20** (249 мг, 57%) в виде грязно-белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ=12,00 (уш, 1H), 7,90 (д, J=3,6 Гц, 1H), 6,93 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,45-4,35 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=157,64 (д, J_{CF}=3,0 Гц), 149,70 (д, J_{CF}=6,0 Гц), 148,45 (д, J_{CF}=261,3 Гц), 144,60, 142,99, 131,47 (д, J_{CF}=12,7 Гц), 108,76 (д, J_{CF}=3,5 Гц), 106,38 (д, J_{CF}=3,8 Гц), 64,69, 63,98 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_8FN_2O_3^+$, 223,0513; обнаружено 223,0510.

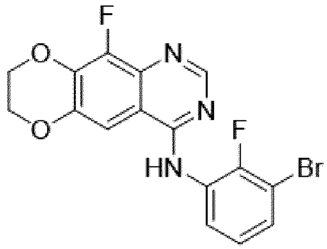
*4-Хлор-5-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин (**21**).*



Перемешиваемую суспензию **20** (90 мг, 0,41 ммоль) в толуоле (1,2 мл) обрабатывали с помощью DIPEA (215 мкл, 1,24 ммоль) с последующим добавлением по каплям $POCl_3$ (100 мкл, 1,09 ммоль) при 10°C. Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч., затем при 88°C в течение 5 ч. и концентрировали. Остаток обрабатывали с помощью насыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (10 мл) при 0°C, разбавляли водой (5 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×7 мл). Объединенные органические вещества промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (7 мл), солевым раствором (7 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения **21** (96 мг, 99%) в виде светло-оранжевого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,83 (с, 1H), 7,35 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,51-4,45 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=156,76 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 152,70 (д, J_{CF}=2,3 Гц), 151,66 (д, J_{CF}=4,9 Гц), 146,08, 144,51 (д, J_{CF}=261,8 Гц), 134,04 (д, J_{CF}=14,0 Гц), 110,85 (д, J_{CF}=7,7 Гц), 109,43 (д, J_{CF}=4,0 Гц), 64,89, 64,37 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_7ClFN_2O_2^+$, 241,0175; обнаружено 241,0176.

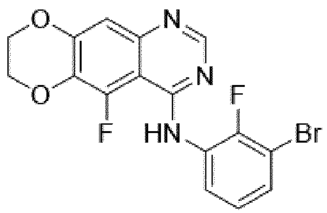
*N-(3-Бром-2-фторфенил)-10-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK071**).*



После общей процедуры **GP-2** соединение **JGK071** получали из хлорхиназолина **17** (35 мг, 0,15 ммоль) и 3-бром-2-фторанилина. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:0 → 8:2) обеспечивала получение **JGK071** (44 мг, 77%) в виде белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ=9,76 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 7,80 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,62 (ддд, J=8,0, 6,3, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,5, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,22 (тд, J=8,0, 1,2 Гц, 1H), 4,53-4,40 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ=156,93 (д, J_{CF}=3,7 Гц), 153,44 (д, J_{CF}=247,5 Гц), 153,12, 144,04 (д, J_{CF}=250,0 Гц), 143,97 (д, J_{CF}=3,2 Гц), 137,04 (д, J_{CF}=10,9 Гц), 135,62 (д, J_{CF}=9,9 Гц), 130,48, 127,89, 127,62 (д, J_{CF}=13,1 Гц), 125,51 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 108,58 (д, J_{CF}=23,4 Гц), 108,51, 103,25 (д, J_{CF}=3,9 Гц), 64,63, 64,21 м.д. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}BrF_2N_3O_2^+$, 393,9997; обнаружено 393,9999.

*N-(3-Бром-2-фторфенил)-5-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK072**).*



После общей процедуры **GP-2** соединение **JGK072** получали из хлорхиназолина **21** (35 мг, 0,15 ммоль) и 3-бром-2-фторанилина. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:0 → 8:2) обеспечивала получение **JGK072** (47 мг, 82%) в виде белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ=8,67 (ддд, J=8,6, 7,2, 1,5 Гц, 1H), 8,62 (с, 1H), 8,52 (дд, J=19,6, 2,2 Гц, 1H), 7,29 (ддд, J=8,1, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,23 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,10 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,48-4,42 м.д. (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ=155,27 (д, J_{CF}=5,2 Гц), 153,90, 150,34 (д, J_{CF}=243,9 Гц), 149,93 (д, J_{CF}=6,2 Гц), 145,75 (д, J_{CF}=250,3 Гц), 144,78, 131,96 (д, J_{CF}=15,6 Гц), 128,43 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,71, 125,20 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 122,48, 109,69 (д, J_{CF}=3,3 Гц), 108,63 (д, J_{CF}=19,2 Гц), 101,42 (д, J_{CF}=7,2 Гц), 64,84, 64,48 м.д. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_{11}BrF_2N_3O_2^+$, 393,9997; обнаружено 393,9996.

Пример 17: Проникновение в головной мозг иллюстративных соединений по изобретению

В таблице 5 раскрыто процентное соотношение между головным мозгом и плазмой крови и несвязанные отношения лекарственных средств в головном мозге к плазме крови указанных лекарственных средств у мышей, не несущих опухоли.

Таблица 5. Проникновение в головной мозг иллюстративных соединений по изобретению

Соединение	**Проникновение в головной мозг (% плазмы крови)**	**Kpuu (Avg)**
Эрлотиниб	8,50	0,051
JGK005	64,8	0,491
JGK038	84,3	0,575
JGK028	106,2	1,037
JGK010	106,4	1,045
JGK037	212,1	1,301
JGK042	167,6	1,033
JGK063	72,5	0,341
JGK066	274,3	1,175
JGK068	354,5	1,184
JGK068S	378,3	1,181
JGK074	166,2	не обнаружено
JGK083S	231,3	0,798

Пример 18: Получение иллюстративных соединений серии JGK

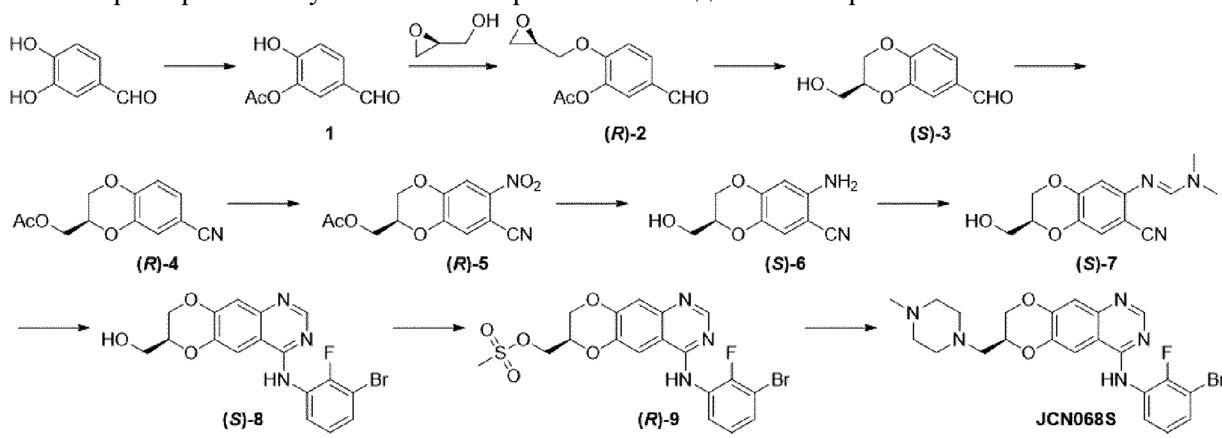


Схема 1. Синтез JGK068S.

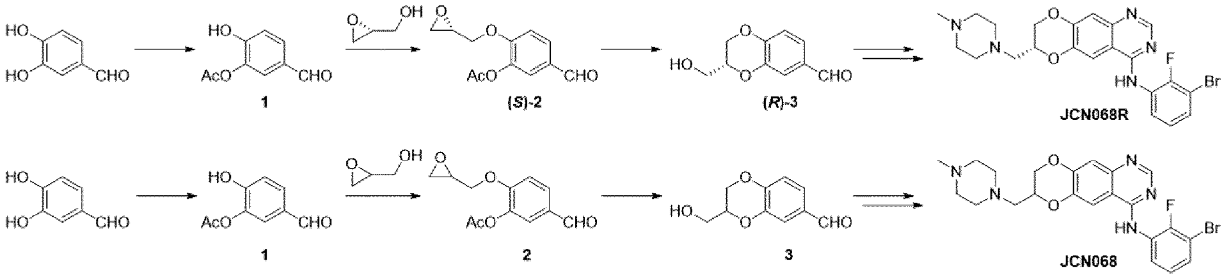


Схема 2. Получение (*R*)-энантиомера **JGK068R или** рацемических смесей (**JGK068**) происходит аналогичным способом, как показано на схеме 1, но использует (*R*)- или рацемический глицидол соответственно.

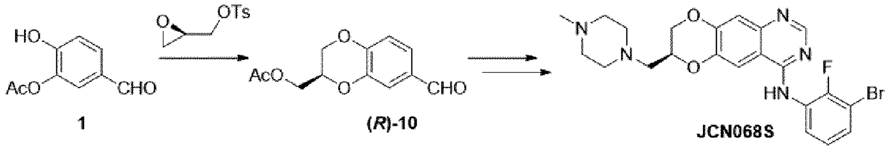


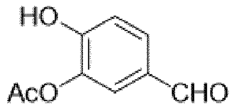
Схема 3. Синтез бензодиоксанкарбальдегида (*R*)-**10** на одной стадии из бензальдегида **1** хиральным глицидилтозилатом. В этом способе отсутствует реакция Мицунобу на схеме 1 (получение **2** из **1**). Соединение (*R*)-**10** может использоваться в способе, показанном на схеме 1, для получения **JGK068S**.

Общая химическая информация

Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Реакции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора CEM Discover. Реакции при комнатной температуре (к. т.) проводили при температуре окружающей среды (приблизительно 23°C). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60 F_{254} с пятнами, визуализированными УФ-светом (λ=254, 365 нм) или с использованием щелочного раствора $KMnO_4$. Колоночную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на SiO_2 60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Препаративную тонкослойную хроматографию (ПТСХ) проводили с пластинами силикагеля Merck 60 F_{254} (20×20 см, 210-270 мм) или пластинами для ТСХ Analtech Silica Gel GF (20×20 см, 1000 мм). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при 23-50°C. Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса (^{1}H ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода (^{13}C ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР (δ ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные ^{1}H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm;

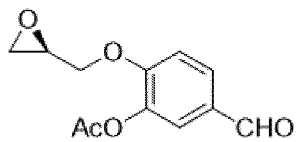
множественность (s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, quint=квинтет, m=мультиплет/смешанный тип, td=триплет дублетов, ddd=дублет дублетов дублетов, br=широкий сигнал); постоянные взаимодействия (*J*) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР ^{13}C представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействия. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART или на масс-спектрометре Waters LCT Premier с ACQUITY UPLC с автопробоотборником.

*5-Формил-2-гидроксифенилацетат (**1**).*



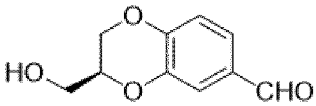
Смесь 3,4-дигидроксибензальдегида (100 г, 0,724 моль) в ТГФ (965 мл) охлаждали до 0°C и обрабатывали с помощью 10% водн. раствора NaOH (724 мл, 1,81 моль) в течение 4-5 мин. После перемешивания реакционной смеси при 0°C в течение 15 мин. ангидрид уксусной кислоты (Ac_2O, 82,1 мл, 0,869 моль) добавляли по каплям в течение 20 мин. Смесь перемешивали в течение 30 мин. при такой же температуре и затем выливали в смесь EtOAc (1,25 л) и 2 M HCl (1,13 л) при 0°C. Фазы разделяли и водн. фазу экстрагировали с помощью EtOAc (4×250 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (2×500 мл), солевым раствором (500 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Остаток обрабатывали с помощью небольшого количества *н*-гептана и выпаривали (3x). Повторная кристаллизация EtOAc (275 мл; кристаллы промывали с помощью Et_2O) обеспечивала первую партию указанного в заголовке соединения **1** (66,96 г, 51%) в виде светло-коричневых кристаллов. Повторная кристаллизация исходного раствора из EtOAc обеспечивала вторую партию указанного в заголовке соединения **1** (29,436 г, 23%) в виде светло-коричневого твердого вещества. ^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 9,85 (с, 1H), 7,73-7,65 (м, 2H), 7,11 (д, *J*=8,8 Гц, 1H), 6,34 (шир., 1H), 2,39 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 190,40, 168,99, 152,96, 138,81, 130,24, 129,72, 124,13, 117,87, 21,09. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_9H_9O_4^+$, 181,0495; обнаружено 181,0488.

*5-Формил-2-{[(2R)-оксиран-2-ил]метокси}фенилацетат ((R)-**2**).*



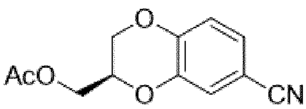
Смесь **1** (32,5 г, 0,18 моль) и трифенилфосфина (PPh_3, 70,976 г, 0,27 моль) в ТГФ (905 мл) обрабатывали с помощью (*S*)-глицидола (17,95 мл, 0,27 моль), охлаждали до 0°C и по каплям обрабатывали с помощью диизопропилазодикарбоксилата (DIAD, 56,8 мл, 0,289 ммоль) в течение 30 мин. Смесь перемешивали в течение дополнительных 10 мин. при 0°C, после чего охлаждающую баню удаляли и перемешивание продолжали при 23°C в течение 15,5 ч. Все летучие вещества выпаривали и неочищенный (*R*)-**2**, полученный в виде коричневого масла, использовали без какой-либо дополнительной очистки на следующей стадии.

*(3S)-3-(Гидроксиметил)-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбальдегид ((S)-**3**).*



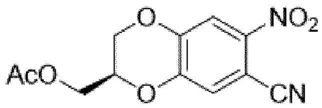
Смесь неочищенного (*R*)-**2** в MeOH (1,564 л) обрабатывали с помощью K_2CO_3 (49,87 г, 0,36 моль) и перемешивали при 23°C в течение 18,5 ч. и затем растворитель выпаривали. Остаток суспендировали в полунасыщ. NH_4Cl (750 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×500 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (250 мл), солевым раствором (250 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Неочищенный материал очищали с помощью нескольких циклов флэш-хроматографии (гексаны/EtOAc 9:1 → 1:1), а также путем преципитации из гексанов/Et_2O 1:1 (для удаления трифенилфосфиноксида Ph_3PO), с получением указанного в заголовке соединения (*S*)-**3** (17,322 г, 49% с двух стадий) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 9,81 (с, 1H), 7,43 (д, *J*=1,8 Гц, 1H), 7,41 (дд, *J*=8,1, 1,9 Гц, 1H), 7,00 (д, *J*=8,2 Гц, 1H), 4,39 (дд, *J*=11,4, 2,3 Гц, 1H), 4,31-4,25 (м, 1H), 4,20 (дд, *J*=11,3, 7,9 Гц, 1H), 3,95 (дд, *J*=12,1, 4,3 Гц, 1H), 3,87 (дд, *J*=12,1, 4,9 Гц, 1H), 2,18 (шир., 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 190,79, 148,76, 143,46, 130,79, 124,46, 118,33, 117,70, 73,31, 65,61, 61,54. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_{11}O_4^+$, 195,0652; обнаружено 195,0650.

*[(2R)-7-Циано-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил]метилацетат ((R)-**4**).*



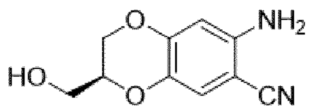
Смесь (*S*)-**3** (17,322 г, 0,089 моль) в AcOH (189 мл) обрабатывали с помощью KOAc (22,944 г, 0,234 моль), перемешивали при 23°C в течение 10 мин. и затем обрабатывали с помощью NH_2OH•HCl (16,233 г, 0,234 моль). Полученную смесь перемешивали при 120-125°C в течение 18,5 ч. Смесь охлаждали до 23 °C, выливали в воду (1 л) и экстрагировали с помощью EtOAc (4×250 мл). Объединенные органические вещества обрабатывали с помощью 3,5 М NaOH (400 мл) и насыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (100 мл) с получением конечного pH ~8, и эмульсию перемешивали при 23°C в течение 1 ч. Органический слой отделяли и промывали насыщ. водн. раствором $NaHCO_3$ (300 мл), водой (300 мл), солевым раствором (300 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством флеш-хроматографии (гексаны/EtOAc 10:1 → 6:4) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (*R*)-**4** (13,513 г, 65%) в виде прозрачного бесцветного масла. ^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 7,20 (д, *J*=2,0 Гц, 1H), 7,16 (дд, *J*=8,4, 2,0 Гц, 1H), 6,94 (д, *J*=8,4 Гц, 1H), 4,43-4,38 (м, 1H), 4,36 (дд, *J*=11,6, 2,4 Гц, 1H), 4,34 (дд, *J*=11,1, 4,5 Гц, 1H), 4,30 (дд, *J*=11,6, 4,6 Гц, 1H), 4,11 (дд, *J*=11,5, 7,2 Гц, 1H), 2,12 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 170,64, 147,13, 143,11, 126,28, 121,56, 118,85, 118,32, 105,13, 71,11, 65,45, 62,24, 20,83. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{12}H_{12}NO_4^+$, 234,0761; обнаружено 234,0759.

*[(2R)-7-Циано-6-нитро-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил]метилацетат ((R)-**5**).*



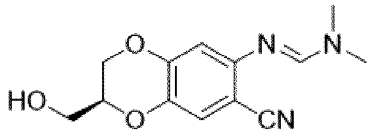
Смесь (*R*)-**4** (13,345 г, 57,2 ммоль) в Ac_2O (74,3 мл) обрабатывали с помощью H_2SO_4 (3,05 мл, 57,2 ммоль), охлаждали до 0°C и по каплям обрабатывали с помощью 70% HNO_3 (19,63 мл, 286 ммоль) при 0°C в течение 35 мин. Смесь перемешивали в течение других 2 ч. при 0°C и затем при 23°C в течение 3,5 ч. Смесь выливали в ледяную воду (850 мл) и pH регулировали до ~7 с помощью 6 M NaOH (320 мл). Насыщ. водн. раствор $NaHCO_3$ (200 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (3×500 мл). Объединенные органические вещества промывали насыщ. водн. раствором $NaHCO_3$ (400 мл), водой (400 мл), солевым раствором (400 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения (*R*)-**5** (15,696 г, 99%) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6): δ 7,96 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 4,73-4,67 (м, 1H), 4,58 (дд, *J*=11,8, 2,6 Гц, 1H), 4,36 (дд, *J*=12,5, 3,7 Гц, 1H), 4,31 (дд, *J*=12,5, 5,7 Гц, 1H), 4,27 (дд, *J*=11,8, 7,0 Гц, 1H), 2,05 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d_6): δ 170,11, 147,75, 146,26, 142,23, 123,77, 115,21, 115,17, 100,06, 72,00, 64,98, 61,72, 20,52. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{12}H_{11}N_2O_6^+$, 279,0612; обнаружено 279,0601.

(3S)-7-Амино-3-(гидроксиметил)-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбонитрил ((S)-6).



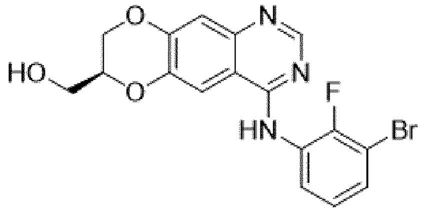
Суспензию (*R*)-**5** (15,591 г, 56 ммоль) в воде/этаноле 1:1 (250 мл) обрабатывали с помощью $Na_2S_2O_4$ (39,266 г, 185 ммоль) и смесь перемешивали при 50°C в течение 105 мин. и затем нагревали до 70°C в течение 2 ч. с одновременной обработкой порциями конц. HCl (73,6 мл, 0,897 моль) в это время. Смесь охлаждали до 23°C, выливали на лед и pH регулировали до ~10 с помощью 6 M NaOH (200 мл) и полунасыщ. $NaHCO_3$ (500 мл). Смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×500 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (500 мл), солевым раствором (500 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением неочищенного (*S*)-**6** (9,483 г, 82%) в виде оранжево-желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6): δ 6,92 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 5,50 (шир., 2H), 5,04 (т, *J*=5,7 Гц, 1H), 4,32 (дд, *J*=10,7, 1,6 Гц, 1H), 4,07-3,99 (м, 1H), 4,00 (дд, *J*=11,2, 8,3 Гц, 1H), 3,64-3,51 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d_6): δ 148,50, 147,29, 134,39, 119,04, 118,04, 102,45, 86,72, 73,25, 65,92, 59,77. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{10}H_{10}N_2O_3^{\bullet+}$, 206,0686; обнаружено 206,0685.

N'-[(2S)-7-Циано-2-(гидроксиметил)-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-ил]-N, N-диметилметан-имидамид ((S)-7).



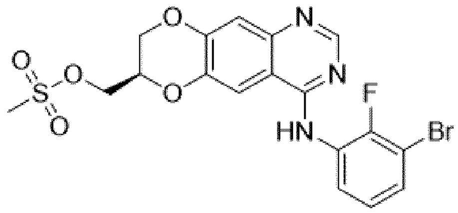
Смесь (S)-**6** (9,38 г, 45,5 ммоль) в толуоле (117 мл) обрабатывали с помощью AcOH (143 мкл, 2,5 ммоль) и DMF-DMA (13,1 мл, 98,9 ммоль) и смесь перемешивали при 105°C в течение 3 ч. Выпаренный MeOH (~4-5 мл) собирали в насадке Дина-Старка для отслеживания хода реакции. Смесь охлаждали до 23°C и выпаривали с получением неочищенного (S)-**7** (14,243 г, колич.) в виде вязкого коричневого масла, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 7,51 (с, 1H), 7,05 (с, 1H), 6,48 (с, 1H), 4,33 (дд, J=11,2, 2,0 Гц, 1H), 4,23-4,17 (м, 1H), 4,13 (дд, J=11,2, 8,1 Гц, 1H), 3,90 (дд, J=12,1, 4,2 Гц, 1H), 3,83 (дд, J=12,1, 4,8 Гц, 1H), 3,07 (с, 3H), 3,05 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 160,40, 153,78, 147,68, 138,63, 121,08, 118,64, 108,16, 99,31, 73,34, 65,83, 61,67, 40,51, 34,82. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{13}H_{16}N_3O_3^+$, 262,1186; обнаружено 262,1183.

*[(7S)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метанол ((S)-**8**).*



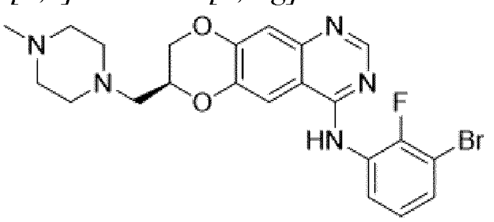
Смесь (S)-**7** в AcOH (152 мл) обрабатывали с помощью 3-бром-2-фторанилина (6,63 мл, 59,1 ммоль) и смесь перемешивали при 125-130°C в течение 3 ч. Смесь охлаждали до 23°C, выливали в ледяную воду (500 мл) и pH регулировали до ~9 насыщ. водн. раствором NH_4OH (185 мл) и полунасыщ. водн. раствором $NaHCO_3$ (200 мл). Смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×400 мл) и объединенные органические вещества промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (400 мл), водой (400 мл), солевым раствором (400 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Остаток растворяли в MeOH (272 мл) и обрабатывали с помощью K_2CO_3 (12,579 г, 91 ммоль), перемешивали при 23°C в течение 1 ч. и выпаривали. Остаток суспендировали в полунасыщ. водн. растворе NH_4Cl (700 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×400 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (400 мл), солевым раствором (400 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Оранжево-желтый остаток суспендировали в EtOAc, нагревали до 65°C и затем обеспечивали медленное охлаждение до 23°C в течение ночи. Фильтрация и промывка остатка холодными гексанами (2×15 мл) и Et_2O (2×15 мл) и высушивание под высоким вакуумом обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (S)-**8** (9,407 г, 50,9% с двух стадий) в виде измельченного желтого порошка. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,69 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,4, 7,0, 1,6 Гц, 1H), 7,24-7,17 (м, 1H), 7,20 (с, 1H), 5,20 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,49 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,37-4,29 (м, 1H), 4,21 (дд, J=11,6, 7,4 Гц, 1H), 3,76-3,64 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d_6): δ 157,22, 153,38 (д, J_{CF}=247,0 Гц), 153,09, 148,87, 145,94, 143,37, 130,08, 128,09 (д, J_{CF}=12,9 Гц), 127,75, 125,43 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 112,29, 109,81, 108,54 (д, J_{CF}=20,0 Гц), 108,49, 73,77, 65,52, 59,76. МСВР (DART): *m/z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{17}H_{14}BrFN_3O_3^+$, 406,0197; обнаружено 406,0185.

*[(7R)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метилметансульфонат ((R)-**9**).*



Смесь (*S*)-**8** (9,01 г, 22,2 ммоль) и Me_3N•HCl (234 мг, 2,45 ммоль) в ацетонитриле (148 мл) обрабатывали с помощью Et_3N (6,18 мл, 44,4 ммоль), охлаждали до 0-5°C и по каплям обрабатывали с помощью раствора MsCl (2,57 мл, 33,2 ммоль) в ацетонитриле (17 мл; промывали с помощью 3 мл) в течение 10 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Воду (100 мл) добавляли и большую часть ацетонитрила выпаривали в вакууме. Дополнительно воду (700 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×400 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (400 мл), солевым раствором (400 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения (*R*)-**9** (10,33 г, 96%) в виде желтой рыхлой пены, которую использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,70 (с, 1H), 8,62 (ддд, *J*=8,7, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,362 (с, 1H), 7,360 (шир., 1H), 7,29 (ддд, *J*=8,1, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, *J*=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,67-4,61 (м, 1H), 4,54-4,51 (м, 2H), 4,50 (дд, *J*=11,7, 2,4 Гц, 1H), 4,29 (дд, *J*=11,8, 7,1 Гц, 1H), 3,13 (с, 3H).

*(7S)-N-(3-бром-2-фторфенил)-7-[(4-Метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино [2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK068S**).*



Смесь (*R*)-**9** в DMF (427 мл) обрабатывали с помощью 1-метилпиперазина (11,83 мл, 107 ммоль) и Et_3N (5,95 мл, 42,7 ммоль), и смесь перемешивали при 85°C в течение 24 ч. Смесь охлаждали до 23°C и выпаривали. Остаток растворяли в EtOAc (1,2 л) и промывали с помощью 0,5 M NaOH (4×250 мл), солевым раствором (250 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством флеш-хроматографии (CH_2Cl_2/MeOH 1:0 → 8:2) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения **JGK068S** (6,013 г, 58% с двух стадий) в виде грязно-белой рыхлой пены. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,67 (с, 1H), 8,63 (ддд, *J*=8,7, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,374 (с, 1H), 7,372 (шир., 1H), 7,32 (с, 1H), 7,26 (ддд, *J*=8,1, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,09 (тд, *J*=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,48-4,40 (м, 2H), 4,14 (дд, *J*=11,8, 8,0 Гц, 1H), 2,77 (дд, J=13,4, 6,0 Гц, 1H), 2,653 (дд, J=13,4, 5,8 Гц, 1H), 2,648 (шир., 4H), 2,51 (шир., 4H), 2,32 (с, 3H).

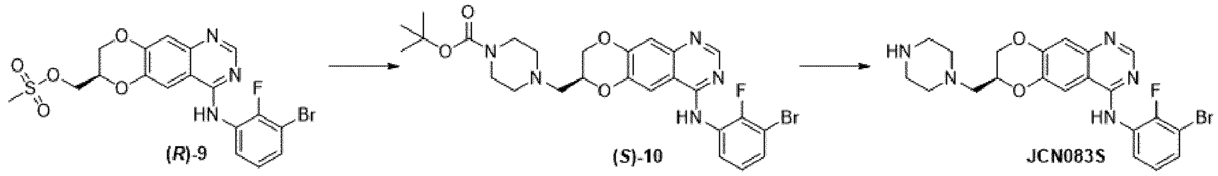
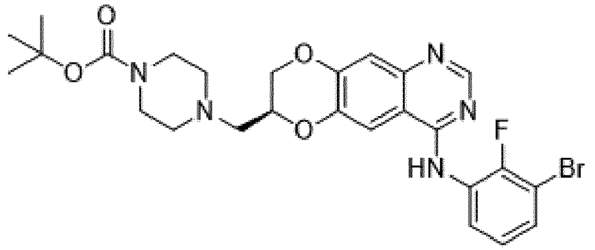


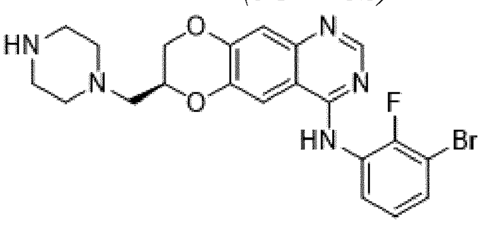
Схема 4. Синтез JGK083S.

*трет-Бутил-{[(7S)-4-(3-бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метил}пиперазин-1-карбоксилат ((S)-**10**).*



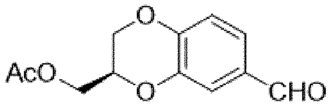
После общей процедуры **GP-1** примера 16 соединение (*S*)-**10** получали из *R*-**9** (91 мг, 0,188 ммоль) и *трет*-бутилпиперазин-1-карбоксилата (175 мг, 0,94 ммоль) в DMF (3,8 мл) и перемешивали при 85°C в течение 15 ч. ПТСХ (CH_2Cl_2/EtOAc 4:6) обеспечивала получение (*S*)-**10** (50 мг, 46%) в виде грязно-белой рыхлой пены. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд, J=8,3, 7,4, 1,5 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (шир., 1H), 7,31 (с, 1H), 7,27 (ддд, J=8,0, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,50-4,42 (м, 2H), 4,17 (дд, J=12,1, 8,2 Гц, 1H), 3,47 (т, J=5,1 Гц, 4H), 2,78 (дд, J=13,4, 5,9 Гц, 1H), 2,67 (дд, J=13,5, 5,9 Гц, 1H), 2,62-2,47 (м, 4H), 1,47 (с, 9H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 155,89, 154,83, 153,39, 150,15 (д, J_{CF}=242,4 Гц), 149,36, 146,72, 144,02, 128,63 (д, J_{CF}=10,3 Гц), 127,27, 125,34, 121,78, 114,34, 110,66, 108,60 (д, J_{CF}=19,5 Гц), 106,06, 79,97, 71,76, 67,18, 58,56, 53,96, 28,57, один сигнал углерода отсутствует (возможно из-за перекрывающихся пиков). МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{26}H_{30}BrFN_5O_4^+$, 574,1460; обнаружено 574,1432.

*(7S)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(пиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK083S**).*



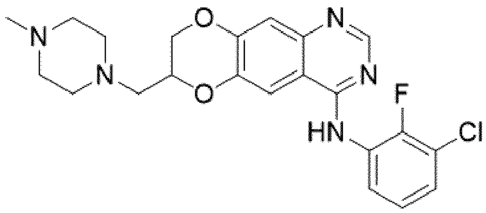
Смесь (*S*)-**10** (42 мг, 0,073 ммоль) в CH_2Cl_2 (500 мкл) и TFA (250 мкл) перемешивали при 23°C в течение 12 ч. Смесь разбавляли с помощью 1 M HCl (20 мл) и промывали с помощью CH_2Cl_2 (3×7 мл). Водную фазу разбавляли с помощью 6 M NaOH (4 мл) до pH >12 и экстрагировали с помощью EtOAc (3×8 мл). Объединенные органические вещества промывали солевым раствором (8 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ПТСХ (CH_2CL_2/MeOH 8:2) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения **JGK083S** (18 мг, 52%) в виде белой рыхлой пены. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,68 (с, 1H), 8,66 (ддд, *J*=8,2, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,35 (шир. д, *J*=4,0 Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,27 (ддд, *J*=8,1, 6,5, 1,6 Гц, 1H), 7,11 (тд, *J*=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,50-4,42 (м, 2H), 4,19-4,13 (м, 1H), 2,93 (т, *J*=4,9 Гц, 4H), 2,76 (дд, *J*=13,4, 5,9 Гц, 1H), 2,63 (дд, *J*=13,4, 6,0 Гц, 1H), 2,63-2,50 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 155,88, 153,35, 150,12 (д, J_{CF}=242,3 Гц), 149,45, 146,71, 144,17, 128,67 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,21, 125,32 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,74, 114,30, 110,64, 108,58 (д, J_{CF}=19,3 Гц), 106,02, 71,70, 67,32, 59,19, 55,54, 46,23. МСВР (DART): *m*/*z* $[M - H]^-$ рассч. для $C_{21}H_{20}BrFN_5O_2^-$, 472,0790; обнаружено 472,0773.

*[(2R)-7-Формил-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил]метилацетат ((R)-**10**).*



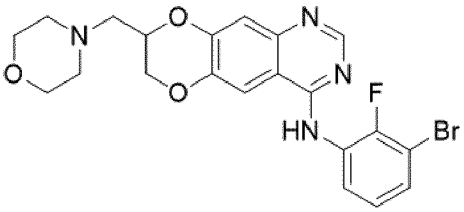
Смесь **1** (150 мг, 0,833 ммоль) и (2*R*)-глицидилтозилата (203 мг, 0,891 ммоль) в DMF (2 мл) обрабатывали с помощью K_2CO_3 (181 мг, 1,31 ммоль) и смесь перемешивали при 60°C в течение 15 ч. Смесь охлаждали до 23°C, воду (30 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×15 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (15 мл), солевым раствором (15 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством препаративной тонкослойной хроматографии (гексаны/EtOAc 7:3) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (*R*)-**10** (111 мг, 56%) в виде прозрачного бесцветного масла. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ=9,82 (с, 1H), 7,44 (д, *J*=1,8 Гц, 1H), 7,42 (дд, *J*=8,2, 1,9 Гц, 1H), 7,00 (д, *J*=8,1 Гц, 1H), 4,46-4,39 (м, 1H), 4,37 (дд, *J*=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,35 (дд, *J*=11,7, 4,9 Гц, 1H), 4,31 (дд, *J*=11,9, 5,1 Гц, 1H), 4,13 (дд, *J*=11,5, 7,1 Гц, 1H), 2,11 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): δ 190,72, 170,67, 148,57, 143,22, 131,15, 124,38, 118,76, 117,85, 70,94, 65,54, 62,36, 20,83. МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{12}H_{13}O_5^+$, 237,0757; обнаружено 237,0745.

*(±)-N-(3-Хлор-2-фторфенил)-7-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино [2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK075**).*



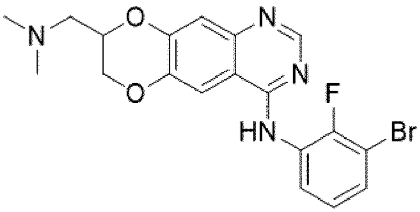
^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,68 (с, 1H), 8,61 (тд, *J*=7,3, 2,2 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,35 (уш д, *J*=3,4 Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,16 (тд, *J*=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,13 (тд, *J*=8,2, 1,9 Гц, 1H), 4,49-4,41 (м, 2H), 4,15 (дд, *J*=11,8, 8,1 Гц, 1H), 2,78 (дд, *J*=13,4, 5,9 Гц, 1H), 2,66 (дд, *J*=13,4, 5,9 Гц, 1H), 2,64 (уш, 4H), 2,48 (уш, 4H), 2,31 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 155,89, 153,35, 149,44, 149,30 (д, J_{CF}=244,2 Гц), 146,72, 144,15, 128,76 (д, J_{CF}=9,3 Гц), 124,71 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 124,45, 121,01, 120,85 (д, J_{CF}=16,1 Гц), 114,30, 110,63, 106,05, 71,81, 67,31, 58,50, 55,17, 54,15, 46,19, МСВР (DART): *m*/*z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{24}ClFN_5O_2^+$, 444,1597; обнаружено 444,1582.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(морфолин-4-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ***(JGK076)***.



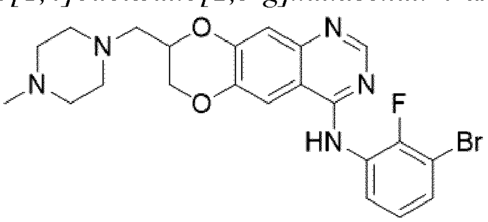
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,5, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 4,63-4,56 (м, 1H), 4,46 (дд, J=11,6, 2,5 Гц, 1H), 4,17 (дд, J=11,6, 7,1 Гц, 1H), 3,59 (т, J=4,6 Гц, 4H), 2,71-2,59 (м, 2H), 2,57-2,44 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,22, 153,37 (д, J_{CF}=247,3 Гц), 153,13, 148,75, 146,16, 143,28, 130,14, 128,02 (д, J_{CF}=13,0 Гц), 127,74, 125,45 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 112,57, 109,61, 108,55 (д, J_{CF}=19,9 Гц), 108,23, 71,41, 66,29, 66,18, 57,97, 53,89, МСВР (DART): m/z [M - H]$^-$ рассч. для $C_{21}H_{19}BrFN_4O_3^-$, 473,0630; обнаружено 473,0608.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(диметиламино)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ***(JGK077)***.



^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,5, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,57-4,51 (м, 1H), 4,44 (дд, J=11,6, 2,5 Гц, 1H), 4,14 (дд, J=11,7, 7,1 Гц, 1H), 2,58 (с, 1H), 2,57 (с, 1H), 2,25 (с, 6H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,22, 153,38 (д, J_{CF}=247,4 Гц), 153,12, 148,78, 146,16, 143,29, 130,14, 128,02 (д, J_{CF}=13,1 Гц), 127,75, 125,45 (д, J_{CF}=4,4 Гц), 112,54, 109,59, 108,55 (д, J_{CF}=19,8 Гц), 108,20, 71,76, 66,31, 58,73, 45,92, МСВР (DART): m/z [M - H]$^-$ рассч. для $C_{19}H_{17}BrFN_4O_2^-$, 431,0524; обнаружено 431,0503.

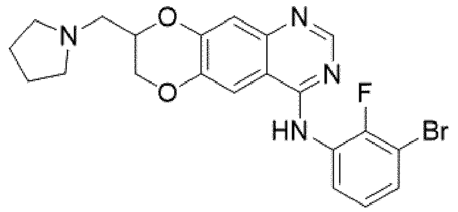
(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ***(JGK078)***.



^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,5, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 4,60-4,53 (м, 1H), 4,44 (дд, J=11,6, 2,5 Гц, 1H), 4,14 (дд, J=11,7, 7,1 Гц, 1H), 2,68-2,59 (м, 2H), 2,53 (уш, 4H), 2,34 (уш, 4H), 2,16 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,22, 153,38 (д,

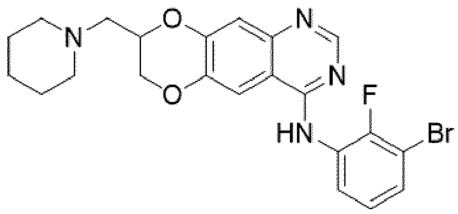
J_{CF}=247,4 Гц), 153,12, 148,78, 146,15, 143,29, 130,13, 128,02 (д, J_{CF}=13,1 Гц), 127,74, 125,45 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 112,55, 109,60, 108,55 (д, J_{CF}=19,8 Гц), 108,22, 71,57, 66,34, 57,52, 54,68, 53,29, 45,72, МСВР (DART): *m/z* [M - H]$^-$ рассч. для $C_{22}H_{22}BrFN_5O_2^-$, 486,0946; обнаружено 486,0928.

*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(пирролидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK079**).*



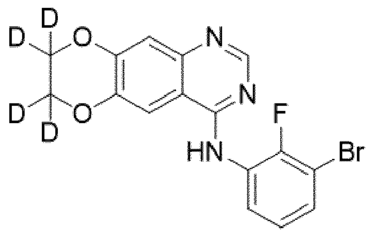
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,3, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,5, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,0, 1,2 Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 4,57-4,49 (м, 1H), 4,46 (дд, J=11,6, 2,5 Гц, 1H), 4,16 (дд, J=11,6, 7,1 Гц, 1H), 2,80 (дд, J=12,8, 6,0 Гц, 1H), 2,73 (дд, J=12,8, 6,2 Гц, 1H), 2,62-2,48 (м, 4H), 1,74-1,66 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,22, 153,37 (д, J_{CF}=247,5 Гц), 153,12, 148,79, 146,17, 143,29, 130,13, 128,02 (д, J_{CF}=12,9 Гц), 127,74, 125,45 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 112,54, 109,58, 108,55 (д, J_{CF}=20,0 Гц), 108,19, 72,65, 66,32, 55,42, 54,31, 23,23, МСВР (DART): *m/z* [M - H]$^-$ рассч. для $C_{21}H_{19}BrFN_4O_2^-$, 457,0681; обнаружено 457,0660.

*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(пиперидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK080**).*



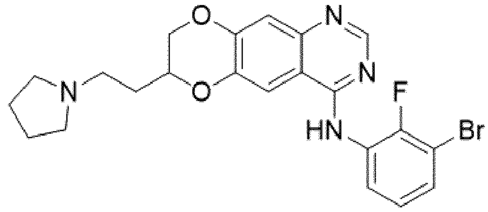
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,3, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,4, 7,0, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,18 (с, 1H), 4,59-4,52 (м, 1H), 4,44 (дд, J=11,6, 2,5 Гц, 1H), 4,14 (дд, J=11,7, 7,1 Гц, 1H), 2,65-2,54 (м, 2H), 2,53-2,37 (м, 4H), 1,55-1,47 (м, 4H), 1,43-1,34 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,21, 153,37 (д, J_{CF}=247,1 Гц), 153,11, 148,83, 146,15, 143,32, 130,12, 128,03 (д, J_{CF}=13,1 Гц), 127,73, 125,45 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 112,53, 109,57, 108,55 (д, J_{CF}=19,8 Гц), 108,19, 71,63, 66,42, 58,35, 54,74, 25,61, 23,83, МСВР (DART): *m/z* [M - H]$^-$ рассч. для $C_{22}H_{21}BrFN_4O_2^-$, 471,0837; обнаружено 471,0814.

*N-(3-Бром-2-фторфенил)(7,7,8,8-$^2H_4$)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK081**).*



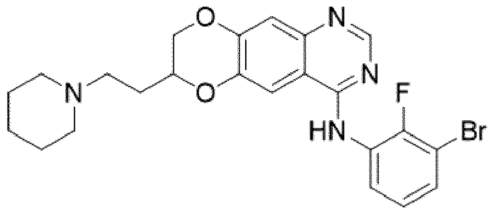
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=7,9, 6,3, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,4, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,19 (с, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,19, 153,37 (д, J_{CF}=247,2 Гц), 153,10, 149,27, 146,03, 143,67, 130,12, 128,03 (д, J_{CF}=13,0 Гц), 127,74, 125,44 (д, J_{CF}=4,2 Гц), 112,47, 109,63, 108,55 (д, J_{CF}=19,9 Гц), 108,35, МСВР (DART): *m/z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{16}H_8D_4BrFN_3O_2^+$, 380,0342; обнаружено 380,0327.

*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(пирролидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK084**).*



^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,60 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,58 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,53 (ддд, J=8,4, 7,0, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,1 Гц, 2H), 7,20 (с, 1H), 4,50 (дд, J=11,5, 2,3 Гц, 1H), 4,42-4,36 (м, 1H), 4,12 (дд, J=11,5, 7,7 Гц, 1H), 2,70-2,56 (м, 2H), 2,49-2,40 (м, 4H), 1,89-1,78 (м, 2H), 1,73-1,64 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,21, 153,33 (д, J_{CF}=247,5 Гц), 153,13, 148,95, 146,02, 143,37, 130,08, 128,07 (д, J_{CF}=13,1 Гц), 127,64, 125,48 (д, J_{CF}=4,6 Гц), 112,26, 109,78, 108,58 (д, J_{CF}=19,8 Гц), 108,44, 71,76, 67,78, 53,63, 51,03, 29,53, 23,16, МСВР (DART): *m/z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{23}BrFN_4O_2^+$, 473,0983; обнаружено 473,0976.

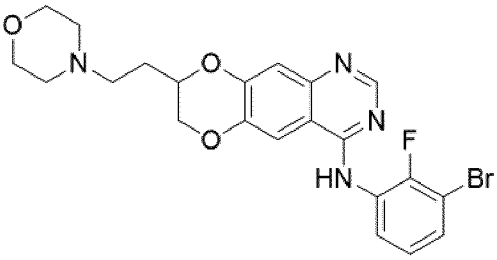
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(пиперидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK085**).*



^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,60 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,58 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,53 (ддд, J=8,4, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,204 (тд, J=8,2, 1,3 Гц, 1H), 7,198 (с, 1H), 4,51 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,39-4,33 (м, 1H), 4,11 (дд, J=11,6, 7,8 Гц, 1H), 2,50-2,44 (м, 2H), 2,42-2,27 (м, 4H), 1,90-1,76 (м, 2H), 1,55-1,45 (м, 4H), 1,42-1,34 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,20, 153,33 (д, J_{CF}=247,4 Гц), 153,12, 148,95, 146,02, 143,39, 130,08, 128,07 (д, J_{CF}=13,1 Гц), 127,64, 125,48 (д, J_{CF}=4,5 Гц), 112,25, 109,77, 108,58 (д, J_{CF}=20,0 Гц), 108,43, 71,97, 67,80, 54,08, 53,96, 27,69, 25,61, 24,12, МСВР (DART): *m/z* $[M+H]^+$ рассч. для

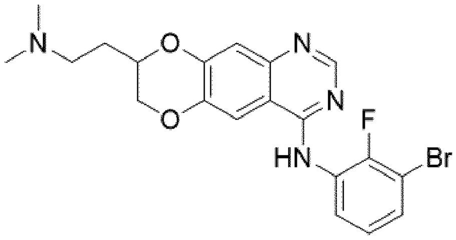
$C_{23}H_{25}BrFN_4O_2^+$, 487,1139; обнаружено 487,1137.

*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(морфолин-4-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK086**).*



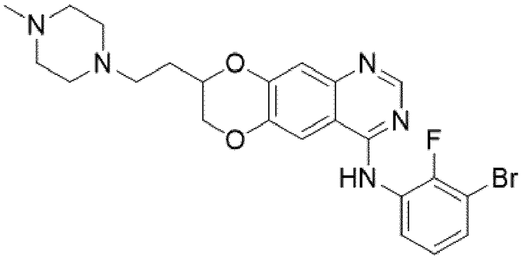
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,63 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,58 (ддд, J=8,0, 6,3, 1,5 Гц, 1H), 7,53 (т, J=7,0 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 4,50 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,47-4,40 (м, 1H), 4,10 (дд, J=11,6, 7,4 Гц, 1H), 3,58 (т, J=4,7 Гц, 4H), 2,55-2,46 (м, 2H), 2,45-2,33 (м, 4H), 1,92-1,79 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,20, 153,33 (д, J_{CF}=248,3 Гц), 153,06, 148,94, 146,06, 143,26, 130,03, 128,12 (д, J_{CF}=9,8 Гц), 127,69, 125,44 (д, J_{CF}=4,4 Гц), 112,47, 109,64, 108,55 (д, J_{CF}=19,9 Гц), 108,18, 72,30, 67,35, 66,22, 53,53, 53,28, 27,25, МСВР (DART): *m/z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{23}BrFN_4O_3^+$, 489,0932; обнаружено 489,0926.

*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(диметиламино)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK087**).*



^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т, J=6,9 Гц, 1H), 7,54 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,21 (т, J=8,1 Гц, 1H), 7,18 (с, 1H), 4,49 (дд, J=11,6, 2,3 Гц, 1H), 4,45-4,38 (м, 1H), 4,09 (дд, J=11,6, 7,5 Гц, 1H), 2,47-2,38 (м, 2H), 2,17 (с, 6H), 1,86-1,78 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,20, 153,37 (д, J_{CF}=247,6 Гц), 153,08, 148,99, 146,14, 143,29, 130,10, 128,07 (д, J_{CF}=15,6 Гц), 127,72, 125,44 (д, J_{CF}=4,4 Гц), 112,50, 109,58, 108,54 (д, J_{CF}=19,7 Гц), 108,13, 72,30, 67,36, 54,43, 45,17, 28,27, МСВР (DART): *m/z* $[M+H]^+$ рассч. для $C_{20}H_{21}BrFN_4O_2^+$,447,0826; обнаружено 447,0818.

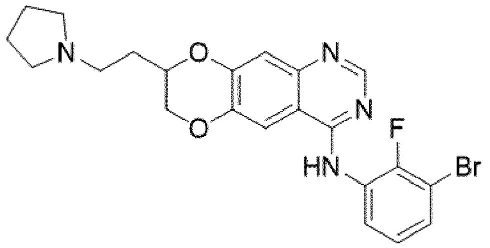
*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK088**).*



^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т, J=7,1

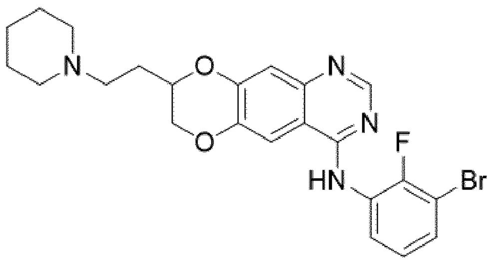
Гц, 1H), 7,54 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,21 (т, J=8,0 Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,49 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,45-4,38 (м, 1H), 4,10 (дд, J=11,6, 7,4 Гц, 1H), 2,48-2,21 (м, 10H), 2,14 (с, 3H), 1,91-1,76 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,20, 153,36 (д, J_{CF}=246,9 Гц), 153,08, 148,98, 146,13, 143,28, 130,09, 128,05 (д, J_{CF}=11,7 Гц), 127,72, 125,44 (д, J_{CF}=4,3 Гц), 112,50, 109,58, 108,55 (д, J_{CF}=19,8 Гц), 108,13, 72,40, 67,37, 54,78, 53,11, 52,65, 45,76, 27,61, МСВР (DART): m/z [M+H]$^+$ рассч. для $C_{23}H_{26}BrFN_5O_2^+$, 502,1248; обнаружено 502,1240.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(пирролидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK089**).



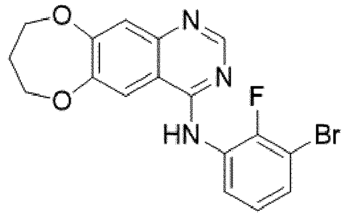
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т, J=7,2 Гц, 1H), 7,53 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,21 (т, J=8,0 Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,49 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,47-4,41 (м, 1H), 4,10 (дд, J=11,5, 7,4 Гц, 1H), 2,68-2,53 (м, 2H), 2,50-2,40 (м, 4H), 1,89-1,81 (м, 2H), 1,73-1,65 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,20, 153,36 (д, J_{CF}=246,9 Гц), 153,07, 148,98, 146,13, 143,28, 130,07, 128,10, 127,71, 125,44 (д, J_{CF}=4,6 Гц), 112,48, 109,60, 108,55 (д, J_{CF}=19,8 Гц), 108,15, 72,31, 67,37, 53,57, 50,97, 29,58, 23,14, МСВР (DART): m/z [M+H]$^+$ рассч. для $C_{22}H_{23}BrFN_4O_2^+$, 473,0983; обнаружено 473,0976.

*(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(пиперидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK090**).*



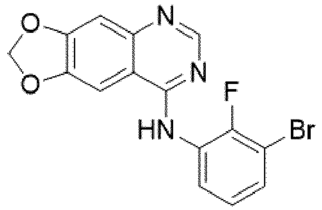
^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 9,62 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т, J=7,1 Гц, 1H), 7,53 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,0, 1,2 Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,49 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,44-4,37 (м, 1H), 4,10 (дд, J=11,6, 7,4 Гц, 1H), 2,48-2,43 (м, 2H), 2,41-2,27 (м, 4H), 1,90-1,77 (м, 2H), 1,54-1,45 (м, 4H), 1,42-1,34 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 157,19, 153,34 (д, J_{CF}=246,7 Гц), 153,07, 149,00, 146,11, 143,29, 130,07, 128,10, 127,71, 125,44 (д, J_{CF}=4,3 Гц), 112,48, 109,60, 108,55 (д, J_{CF}=19,9 Гц), 108,14, 72,50, 67,40, 54,02, 53,87, 27,70, 25,63, 24,13, МСВР (DART): m/z [M+H]$^+$ рассч. для $C_{23}H_{25}BrFN_4O_2^+$, 487,1139; обнаружено 487,1133.

*N-(3-Бром-2-фторфенил)-8,9-дигидро-7H-[1,4]диоксепино[2,3-g]хиназолин-4-амин (**JGK091**).*



^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,71 (с, 1H), 8,65 (ддд, J=8,3, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,48 (с, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,39 (уш, 1H), 7,28 (ддд, J=8,1, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,41 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,38 (т, J=5,8 Гц, 1H), 2,32 (р, J=5,8 Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 157,06, 156,08, 153,93, 151,62, 150,19 (д, J_{CF}=242,7 Гц), 147,83, 128,53 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,39, 125,32 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,84, 119,15, 111,47, 110,85, 108,62 (д, J_{CF}=19,3 Гц), 70,86, 70,51, 31,03, МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{17}H_{14}BrFN_3O_2^+$, 390,0248; обнаружено 390,0236.

*N-(3-Бром-2-фторфенил)-2H-[1,3]диоксоло[4,5-g]хиназолин-8-амин (**JGK092**).*



^1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,69 (с, 1H), 8,58 (ддд, J=8,3, 7,3, 1,5 Гц, 1H), 7,28 (ддд, J=8,1, 6,5, 1,6 Гц, 1H), 7,25 (шир., 1H), 7,14 (с, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 6,17 (с, 2H), сигнал одного протона отсутствует (возможно спрятан сигналом хлороформа). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ 156,10, 153,37, 153,22, 150,22 (д, J_{CF}=242,3 Гц), 149,37, 148,43, 128,67 (д, J_{CF}=10,4 Гц), 127,28, 125,30 (д, J_{CF}=4,7 Гц), 121,84, 110,75, 108,64 (д, J_{CF}=19,4 Гц), 106,29, 102,48, 96,49. МСВР (DART): m/z $[M+H]^+$ рассч. для $C_{15}H_{10}BrFN_3O_2^+$, 361,9935; обнаружено 361,9925.

Пример 19: Исследования метаболизма иллюстративных соединений серии JGK

Иллюстративные соединения (10 мМ) инкубировали в микросомах печени человека, собаки, мыши или крысы (1 мг/мл) в течение до 90 минут при 37°C. Реакции останавливали добавлением ацетонитрила. Параллельно проводили контрольные (не содержащие соединения) исследования микросом. ЖХМС-исследования проводили на приборе Waters Xevo G2 QTof, оборудованном колонкой Luna Omega Polar C18, 1,6 м, 2,1×30 мм. Структуры иллюстративных метаболитов изображены на фиг. 47.

Модификация	**Человек (%)**	**Собака (%)**	**Мышь (%)**	**Крыса (%)**
1. Исходный	**67,0**	3,5	59,9	70,2
2. Гидроксилирование	6,0	0,0	0,0	4,8
3. N-деметилирование	13,7	0,9	5,4	8,2
4. Гидроксилирование	4,2	61,9	22,0	21,9
5. Гидроксилирование	0,7	0,0	0,0	0,6
6. N-деалкилирование	6,5	0,0	1,3	2,7

Включение посредством ссылки

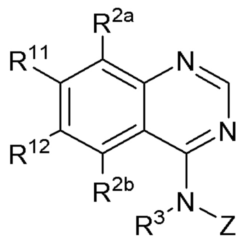
Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, тем самым включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и отдельно указаны для включения в качестве ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая любые определения в данном документе, будет иметь преимущественную силу.

Эквиваленты

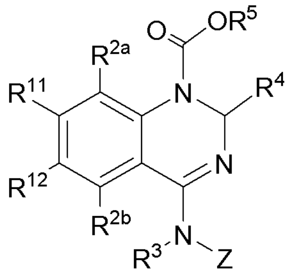
Хотя обсуждались конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничивающим. Многие варианты изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники после ознакомления с настоящим описанием и приведенной ниже формулой изобретения. Полный объем изобретения должен определяться ссылкой на формулу изобретения вместе с полным объемом их эквивалентов и описанием вместе с такими вариациями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение Формулы I или Формулы I*:



(I)



(I*)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

Z представляет собой арил или гетероарил;

каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из водорода, алкила, галогена, CN и NO_2;

R^3 представляет собой водород, алкил или ацил;

R^4 представляет собой алкокси;

R^5 представляет собой алкил; каждый из R^7 и R^8 независимо выбран из водорода, алкила, такого как алкоксиалкил, аралкил или арилацил;

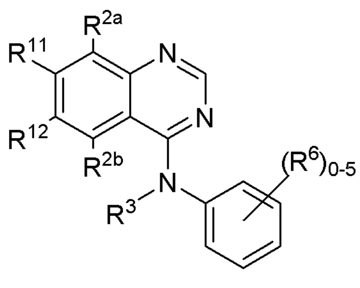
R^{11} представляет собой водород, алкил, галоген, CN, NO_2, OR^7, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; и

R^{12} представляет собой водород, алкил, галоген, CN, NO_2, OR^8, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; или R^{11} и R^{12}, взятые вместе, образуют карбоциклическое или гетероциклическое кольцо.

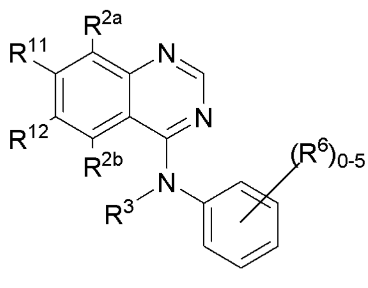
2. Соединение по п. 1, где, если R^{2a} представляет собой водород, R^{2b} выбран из алкила, галогена, CN и NO_2.

3. Соединение по п. 1, где, если R^{2b} представляет собой водород, R^{2a} выбран из алкила, галогена, CN и NO_2.

4. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где соединение представляет собой соединение Формулы (IVa) или Формулы (IVb):



(IVa)



(IVb),

или его фармацевтически приемлемая соль, где

в каждом случае R^6 независимо выбран из алкила, алкокси, OH, CN, NO_2, галогена, алкенила, алкинила, аралкилокси, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила.

5. Соединение по любому из пп. 1-4, где R^{11} представляет собой водород.

6. Соединение по любому из пп. 1-4, где R^{11} представляет собой OR^7.

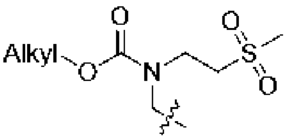
7. Соединение по п. 6, где R^7 представляет собой водород.

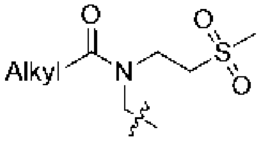
8. Соединение по п. 6, где R^7 представляет собой алкил.

9. Соединение по п. 6, где R^7 представляет собой алкоксиалкил.

10. Соединение по п. 6, где R^7 представляет собой арилацил.

11. Соединение по любому из пп. 1-10, где R^{12} представляет собой гетероарил, такой как фуранил.

12. Соединение по п. 11, где гетероарил замещен алкилом, алкокси, OH, CN, NO_2, галогеном, 

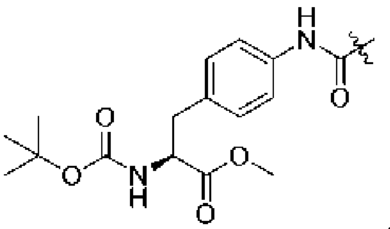
 или 

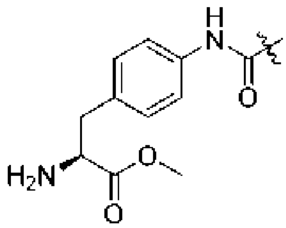
.

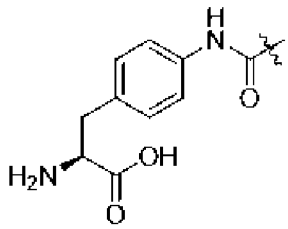
13. Соединение по любому из пп. 1-10, где R^{12} представляет собой OR^8.

14. Соединение по п. 13, где R^8 представляет собой водород.

15. Соединение по п. 13, где R^8 представляет собой алкоксиалкил.

16. Соединение по п. 15, где R^8 представляет собой алкил, замещенный 

, 

 или 

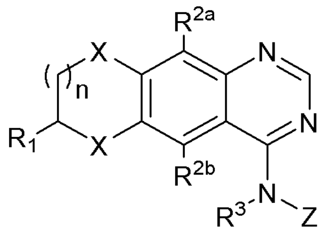
.

17. Соединение по п. 15, где R^8 представляет собой ацил.

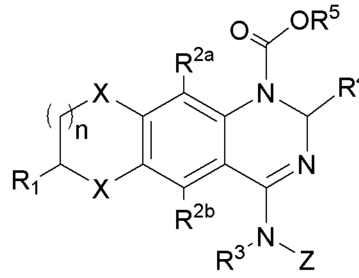
18. Соединение по любому из пп. 1-4, где R^{11} и R^{12} объединены с образованием карбоциклического или гетероциклического кольца, такого как 5-членное, 6-членное или 7-членное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо.

19. Соединение по п. 18, где карбоциклическое или гетероциклическое кольцо замещено гидроксилом, алкилом (например, метилом) или алкенилом (например, винилом).

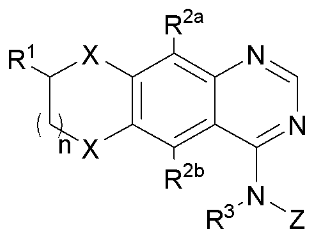
20. Соединение по любому из пп. 1-3, при этом соединение представляет собой соединение Формулы Ia, Ib, Ic или Id:



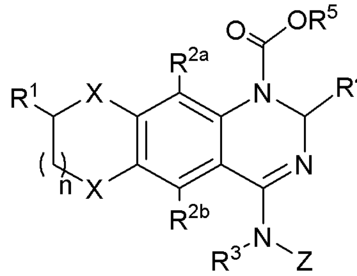
(Ia)



(Ib)



(Ic)



(Id)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

X представляет собой O, S или NH;

Z представляет собой арил или гетероарил;

R^1 представляет собой водород или алкил;

каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из водорода, алкила, галогена, CN и NO_2;

R^3 представляет собой водород, алкил или ацил;

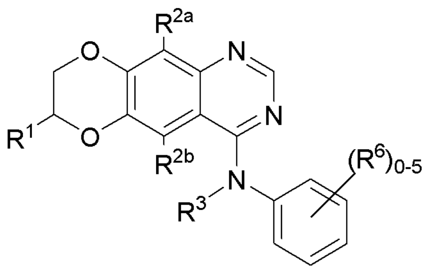
R^4 представляет собой алкокси;

R^5 представляет собой алкил; и

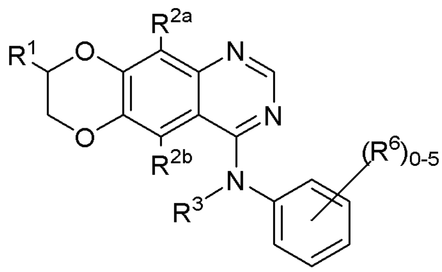
n равно 0-3.

21. Соединение по любому из пп. 1-20, где либо R^{2a}, либо R^{2b} выбран из алкила, галогена, CN и NO_2.

22. Соединение по п. 20 или п. 21, при этом соединение представляет собой соединение Формулы (IIa) или Формулы (IIb):



(IIa)



(IIb)

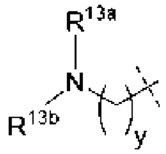
или его фармацевтически приемлемая соль, где

в каждом случае R^6 независимо выбран из алкила, алкокси, OH, CN, NO_2, галогена, алкенила, алкинила, аралкилокси, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила.

23. Соединение по п. 22, где R^1 представляет собой алкил (например, метил или этил), замещенный гетероциклилом (например, азот-содержащий гетероциклил, такой как морфолинил, пиперидинил, пирролодинил или пиперазинил, такой как N-метилпиперазинил).

24. Соединение по п. 22, где R^1 представляет собой алкил (например, метил или этил), замещенный амино (например, диметиламино).

25. Соединение по любому из пп. 20-24, где R^1 представлен Формулой А:



(A),

где,

каждый из R^{13a} и R^{13b} независимо выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила; или R^{13a} и R^{13b} объединены с образованием гетероциклила; и

y равно 0-3.

26. Соединение по п. 22, где R^1 представляет собой алкил (например, метил или этил), замещенный гидроксилом.

27. Соединение по любому из пп. 20-26, где R^1 находится в *S* конфигурации.

28. Соединение по любому из пп. 20-26, где R^1 находится в *R* конфигурации.

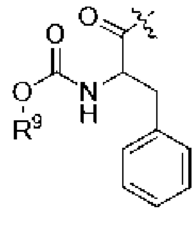
29. Соединение по любому из пп. 1-28, где R^3 представляет собой водород.

30. Соединение по любому из пп. 1-28, где R^3 представляет собой ацил.

31. Соединение по п. 30, где R^3 представляет собой алкилацил.

32. Соединение по п. 30, где R^3 представляет собой алкилоксиацил.

33. Соединение по п. 30, где R^3 представляет собой ацилоксиалкил.

34. Соединение по п. 30, где R^3 представляет собой  ; и

R^9 представляет собой алкил.

35. Соединение по любому из пп. 1-34, где Z представляет собой 2-фтор-3-хлорфенил, 2-фторфенил, 2,3-дифторфенил, 2,4-дифторфенил, 2,5-дифторфенил, 2,6-дифторфенил, 2,4,6-трифторфенил, пентафторфенил, 2-фтор-3-бромфенил, 2-фтор-3-этинилфенил и 2-фтор-3-(трифторметил)фенил.

36. Соединение по любому из пп. 1-34, где Z представляет собой 3-этинилфенил.

37. Соединение по любому из пп. 1-34, где Z представляет собой 3-хлор-4-((3-фторбензил)окси)бензол.

38. Соединение по любому из пп. 1-34, где Z представляет собой 3-хлор-2-

(трифторметил)фенил.

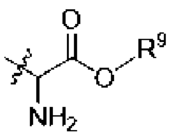
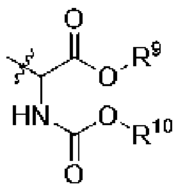
39. Соединение по любому из пп. 1-34, где Z представляет собой 2-фтор-3-бромфенил.

40. Соединение по любому из пп. 1-34, где Z представляет собой 2-фтор-5-бромфенил.

41. Соединение по любому из пп. 1-34, где Z представляет собой 2,6-дифтор-5-бромфенил.

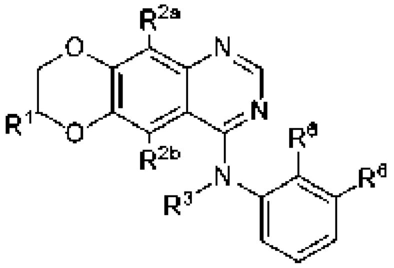
42. Соединение по любому из пп. 1-34, где:

Z замещен одним R^6, выбранным из


или

; и

R^9 и R^{10} независимо выбраны из алкила.

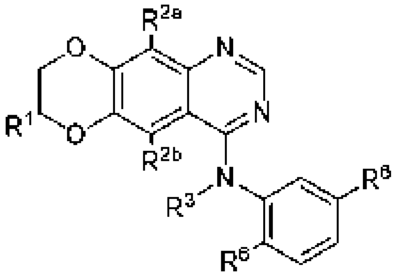
43. Соединение по любому из пп. 1-34, где соединение представляет собой соединение Формулы (IIIa):


(IIIa),

или его фармацевтически приемлемая соль, где

каждый R^6 независимо выбран из фтора, хлора или брома.

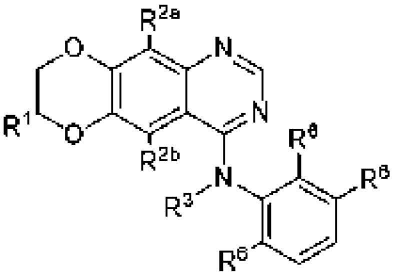
44. Соединение по любому из пп. 1-34, где соединение представляет собой соединение Формулы (IIIb):


(IIIb),

или его фармацевтически приемлемая соль, где

каждый R^6 независимо выбран из фтора, хлора или брома.

45. Соединение по любому из пп. 1-34, где соединение представляет собой соединение Формулы (IIIc):



(IIIc);

или его фармацевтически приемлемая соль, где

каждый R^6 независимо выбран из фтора, хлора или брома.

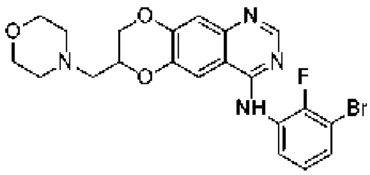
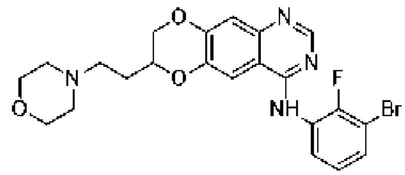
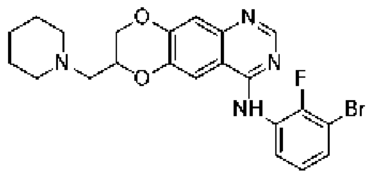
46. Соединение по любому из пп. 1-45, где R^{2a} представляет собой водород.

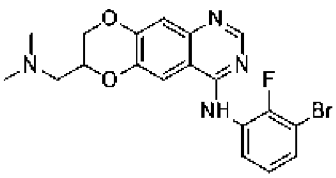
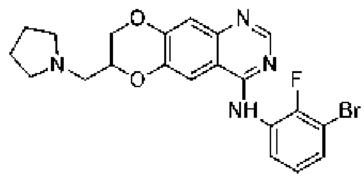
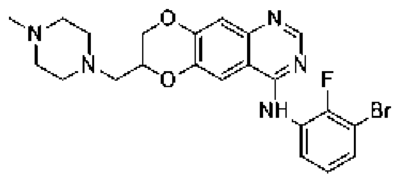
47. Соединение по любому из пп. 1-45, где R^{2a} представляет собой галоген (например, фтор).

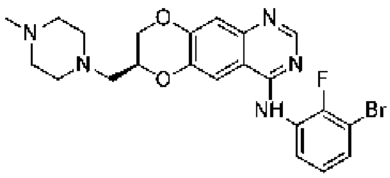
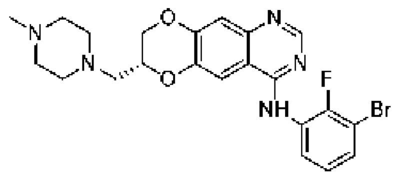
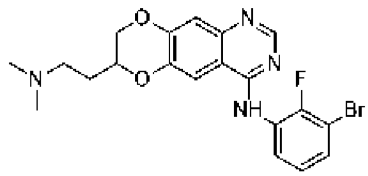
48. Соединение по любому из пп. 1-47, где R^{2b} представляет собой водород.

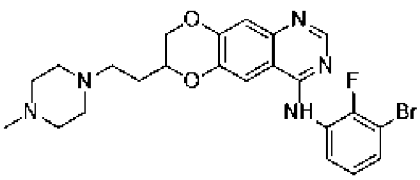
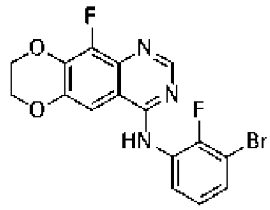
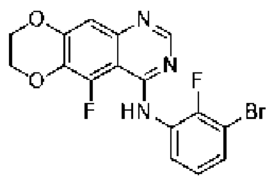
49. Соединение по любому из пп. 1-47, где R^{2b} представляет собой галоген (например, фтор).

50. Соединение по любому из пп. 1-49, где соединение представляет собой:

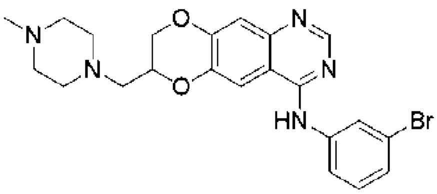
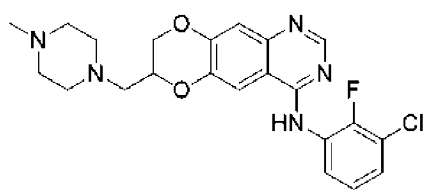
 ,   ,

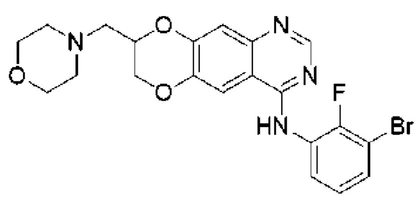
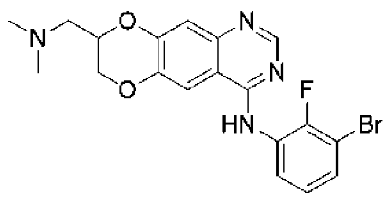
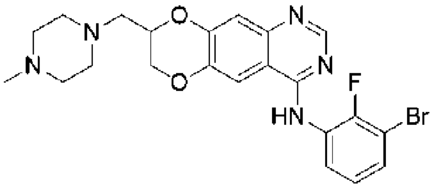
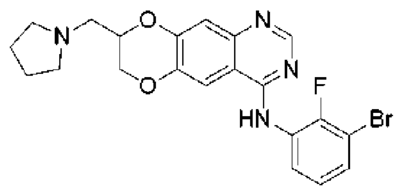
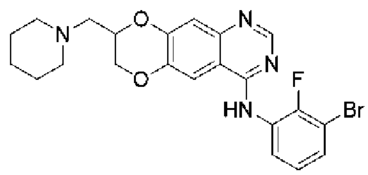
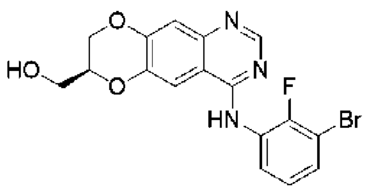
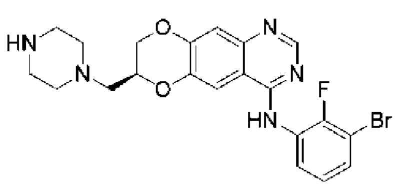
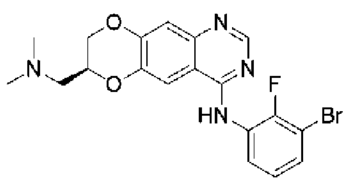
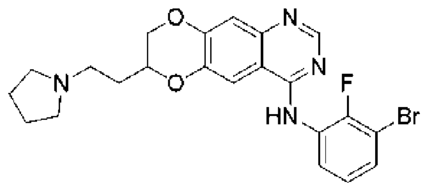
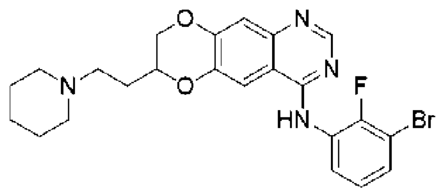
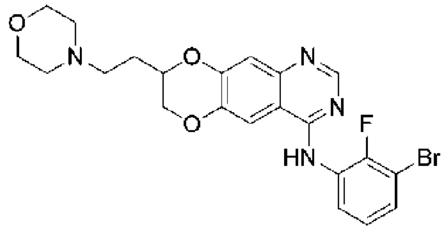
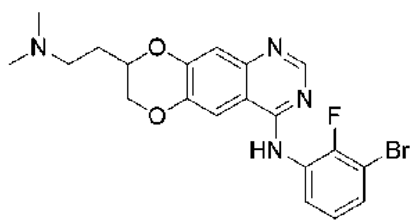
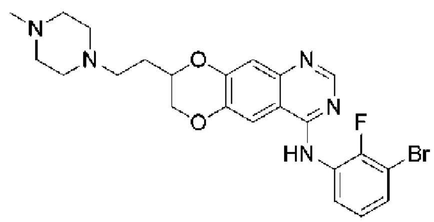
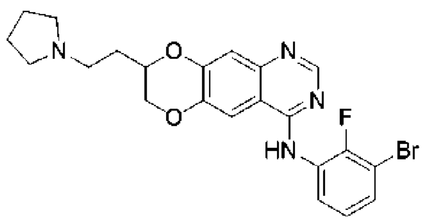
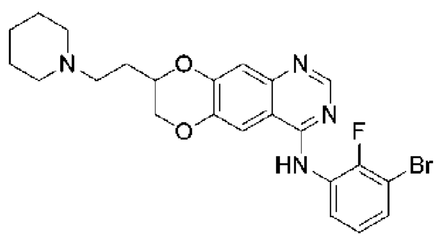
 ,  ,  ,

 ,  ,  ,

 ,  или  ; или его фармацевтически приемлемая соль.

51. Соединение по любому из пп. 1-49, где соединение представляет собой:

 ,  ,

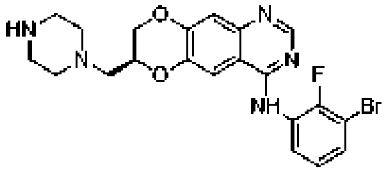

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

и

; или его фармацевтически приемлемая соль.

52. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой:

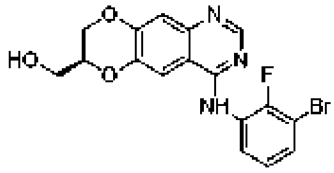

или

; или его фармацевтически приемлемая соль.

53. Соединение по любому из пп. 1-49, где соединение представляет собой:



или



; или его фармацевтически приемлемая соль.

54. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый наполнитель.

55. Способ ингибирования EGFR или его варианта, такого как ΔEGFR, EGFR внеклеточных мутантов, EGFR A289, EGFR T263 и/или активирующих мутантов EGFR, например делеция ex19, включающий введение субъекту соединения или композиции по любому из пп. 1-54.

56. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении рака, соединения или композиции по любому из пп. 1-54.

57. Способ по п. 56, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга, рак груди, рак сердца, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак пищевода, фибросаркому, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы, позвоночника и шеи, саркому Капоши, рак почки, лейкемию, рак печени, лимфому, меланому, множественную миелому, рак поджелудочной железы, рак полового члена, рак половых клеток яичек, карциному тимомы, карциному тимуса, рак легких, рак яичников или рак простаты.

58. Способ по п. 57, в котором рак представляет собой глиому, астроцитому или глиобластому.

59. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту ингибитора метаболизма глюкозы и дополнительного средства, при этом ингибитор метаболизма глюкозы представляет собой соединение по любому из пп. 1-53 или его фармацевтически приемлемую соль и дополнительное средство представляет собой цитоплазматический стабилизатор p53.

60. Способ по п. 59, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга, рак груди, рак сердца, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак пищевода, фибросаркому, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы, позвоночника и шеи, саркому Капоши, рак почки, лейкемию, рак печени, лимфому, меланому, множественную миелому, рак поджелудочной железы, рак полового члена, рак половых клеток яичек, карциному тимомы, карциному тимуса, рак легких, рак яичников или рак простаты.

61. Способ по п. 59, в котором рак представляет собой мультиформную глиобластому, глиому, астроцитому низкой степени злокачественности, смешанную олигоастроцитому, пилоцитарную астроцитому, плеоморфную ксантоастроцитому, субэпендимальную гигантоклеточную астроцитому, анапластическую астроцитому, рак ЦНС, рак, отличный от рака ЦНС, или метастазы в ЦНС, или рак легких.

62. Способ по п. 59, в котором рак представляет собой глиому, астроцитому или глиобластому.

63. Способ по любому из пп. 55-62, при этом способ снижает пролиферацию раковых клеток.

64. Способ по любому из пп. 59-63, в котором у субъекта был установлен рак, чувствительный к ингибиторам метаболизма глюкозы.

65. Способ по п. 64, в котором субъект определен как восприимчивый к ингибитору метаболизма глюкозы с помощью способа, включающего:

a. получение первого образца крови от субъекта;

b. перевод субъекта на кетогенную диету;

c. получение второго образца крови у субъекта после того, как его поместили на кетогенную диету в течение определенного периода времени;

d. измерение уровня глюкозы в первом и втором образцах крови;

e. сравнение уровня глюкозы во втором образце крови с уровнем глюкозы в первом образце крови; и

f. определение того, что субъект является восприимчивым, если уровень глюкозы во втором образце крови снижен по сравнению с уровнями глюкозы в первом образце крови.

66. Способ по п. 65, в котором снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови составляет около или более 0,15 мМ.

67. Способ по п. 65, в котором снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови составляет около или более 0,20 мМ.

68. Способ по п. 65, в котором снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови находится в диапазоне 0,15 мМ - 2,0 мМ.

69. Способ по п. 65, в котором снижение уровня глюкозы между вторым образцом крови и контрольным образцом крови находится в диапазоне 0,25 мМ - 1,0 мМ.

70. Способ по любому из пп. 59-69, где цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор MDM2.

71. Способ по п. 70, где ингибитор MDM2 представляет собой нутлин.

72. Способ по п. 70, где ингибитор MDM2 представляет собой нутлин-3 или идасанутлин.

73. Способ по п. 72, в котором субъекту вводят от 50 мг до 1600 мг идасанутлина.

74. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что субъекту вводят 100 мг идасанутлина.

75. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что субъекту вводят 150 мг идасанутлина.

76. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что субъекту вводят 300 мг идасанутлина.

77. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что субъекту вводят 400 мг идасанутлина.

78. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что субъекту вводят 600 мг

идасанутлина.

79. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что субъекту вводят 1600 мг идасанутлина.

80. Способ по п. 70, в котором ингибитор MDM2 представляет собой RO5045337, RO5503781, RO6839921, SAR405838, DS-3032, DS-3032b или AMG-232.

81. Способ по любому из пп. 59-70, в котором цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор BCL-2.

82. Способ по п. 81, в котором ингибитор BCL-2 представляет собой антисмысловой олигодезоксинуклеотид G3139, антагонист мРНК SPC2996, венетоклакс (ABT-199), GDC-0199, обатоклакс, паклитаксел, навитоклакс (ABT-263), ABT-737, NU-0129, S 055746 или APG-1252.

83. Способ по любому из пп. 59-70, в котором цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор Bcl-xL.

84. Способ по п. 83,в котором ингибитор Bcl-xL представляет собой WEHI 539, ABT-263, ABT-199, ABT-737, сабутоклакс, AT101, TW-37, APG-1252 или гуммигутовую кислоту.

85. Способ по любому из пп. 59-84, в котором ингибитор метаболизма глюкозы и цитоплазматический стабилизатор p53 вводят в одной и той же композиции.

86. Способ по любому из пп. 59-84, в котором ингибитор метаболизма глюкозы и цитоплазматический стабилизатор p53 вводят в отдельных композициях.

87. Способ по любому из пп. 55-86, в котором рак является рецидивирующим или рефрактерным.

88. Способ по любому из пп. 55-87, в котором рак ранее не лечился.

89. Способ по любому из пп. 59-88, причем способ дополнительно включает применение дополнительной терапии.

90. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор метаболизма глюкозы и цитоплазматический стабилизатор p53, где ингибитор метаболизма глюкозы представляет собой соединение по любому из пп. 1-53.

91. Фармацевтическая композиция по п. 90, в котором цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор MDM2.

92. Фармацевтическая композиция по п. 91, в котором ингибитор MDM2 представляет собой нутлин.

93. Фармацевтическая композиция по п. 91 или п. 92, в котором ингибитор MDM2 представляет собой нутлин-3 или идасанутлин.

94. Фармацевтическая композиция по п. 91, в котором ингибитор MDM2 представляет собой RO5045337, RO5503781, RO6839921, SAR405838, DS-3032, DS-3032b или AMG-232.

95. Фармацевтическая композиция по п. 90, в котором цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор BCL-2.

96. Фармацевтическая композиция по п. 95, в котором где ингибитор BCL-2

представляет собой антисмысловой олигодезоксинуклеотид G3139, антагонист мРНК SPC2996, венетоклакс (ABT-199), GDC-0199, обатоклакс, паклитаксел, навитоклакс (ABT-263), ABT-737, NU-0129, S 055746 или APG-1252.

97. Фармацевтическая композиция по п. 90, в котором цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор Bcl-xL.

98. Фармацевтическая композиция по п. 97, в котором ингибитор Bcl-xL представляет собой WEHI 539, ABT-263, ABT-199, ABT-737, сабутоклакс, AT101, TW-37, APG-1252 или гуммигутовую кислоту.

99. Способ получения соединения по любому из пп. 1-52 или его фармацевтически приемлемой соли согласно Схеме 1 или Схеме 2:

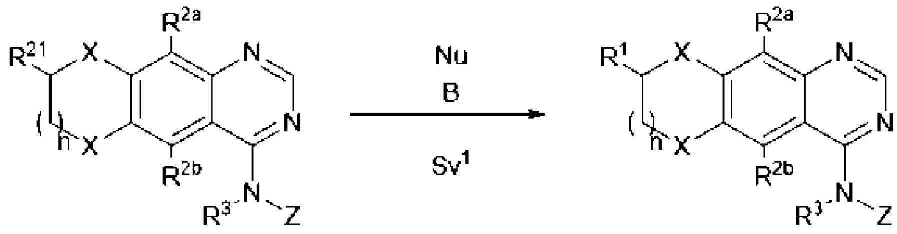


Схема 1

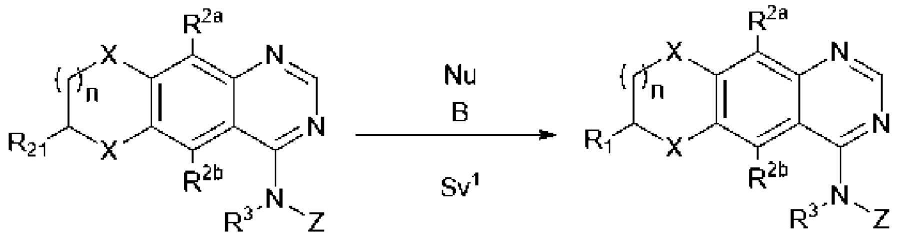


Схема 2

где:

X представляет собой O, S или NH;

Z представляет собой арил или гетероарил;

R^1 представляет собой алкил;

каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из водорода, алкила, галогена, CN и NO_2;

R^3 представляет собой водород, алкил или ацил;

R^4 представляет собой алкокси;

R^5 представляет собой алкил;

R^{21} представляет собой алкил, замещенный уходящей группой, например, галогеналкил или сульфонилалкил;

B представляет собой основание;

Nu представляет собой азот-содержащий гетероцикл (например, имеющий по меньшей одну связь N-H), аминоалкил или гидроксиалкил;

Sv^1 представляет собой растворитель; и

n равно 0-3.

100. Способ по п. 99, где R^{21} представляет собой сульфонилалкил (например, $CH_3S(O)_2OCH_2$-).

101. Способ по п. 99 или 100, где B представляет собой азотистое основание (например, триэтиламин или диизопропилэтиламин).

102. Способ по любому из пп. 99-101, где Nu представляет собой гетероцикл, имеющий по меньшей мере одну связь N-H (например, морфолин, N-метилпиперазин, пиперидин или пирролидин).

103. Способ по любому из пп. 99-102, где Nu представляет собой аминоалкил (например, диметиламин).

104. Способ по любому из пп. 99-103, где растворитель представляет собой апротонный растворитель (например, диметилформамид).

105. Способ по любому из пп. 99-104, причем способ дополнительно включает стадию согласно Схеме 3 или Схеме 4:

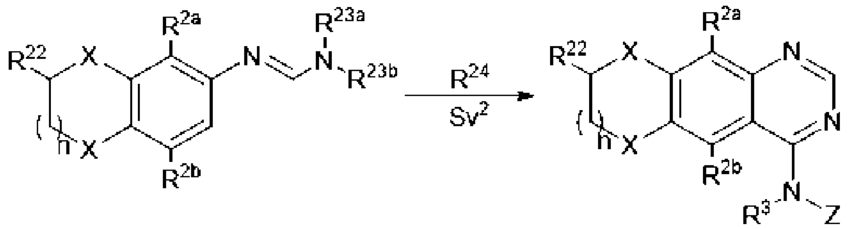


Схема 3

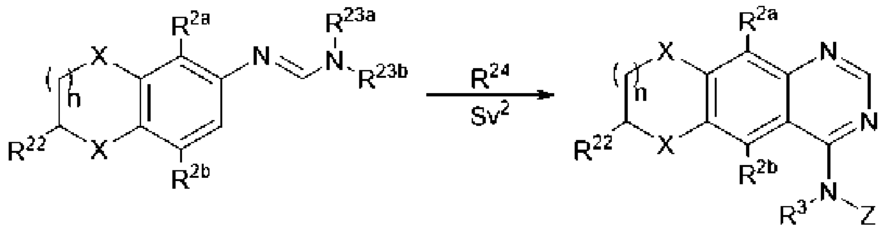


Схема 4

где:

R^{22} представляет собой алкил или гидроксиалкил;

каждый из R^{23a} и R^{23b} представляет собой алкил;

R^{24} представляет собой аминоарил или аминогетероарил; и

Sv^2 представляет собой кислоту.

106. Способ по п. 105, где R^{22} представляет собой гидроксиалкил.

107. Способ по п. 105 или п. 106, где каждый из R^{23a} и R^{23b} представляет собой метил.

108. Способ по любому из пп. 105-107, где R^{24} представляет собой аминоарил.

109. Способ по любому из пп. 105-107, где R^{24} представляет собой аминогетероарил.

110. Способ по любому из пп. 105-109, где Sv^2 представляет собой алкилкислоту (например, уксусную кислоту).

111. Способ по любому из пп. 105-110, где стадию осуществляют при температуре в диапазоне 115-150°C.

112. Способ по п. 111, где стадию осуществляют при температуре в диапазоне 125-130°C.

113. Способ по любому из пп. 105-112, где стадия дополнительно включает

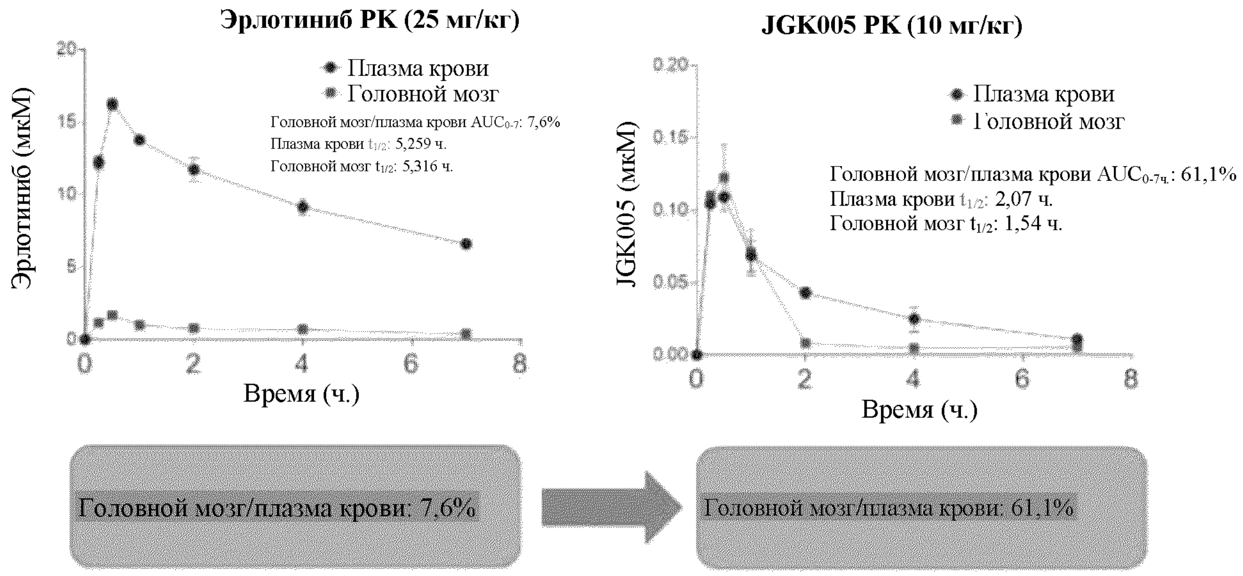
обработку основанием, таким как гидроксид аммония.

114. Способ по любому из пп. 99-113, причем способ дополнительно включает стадию очистки.

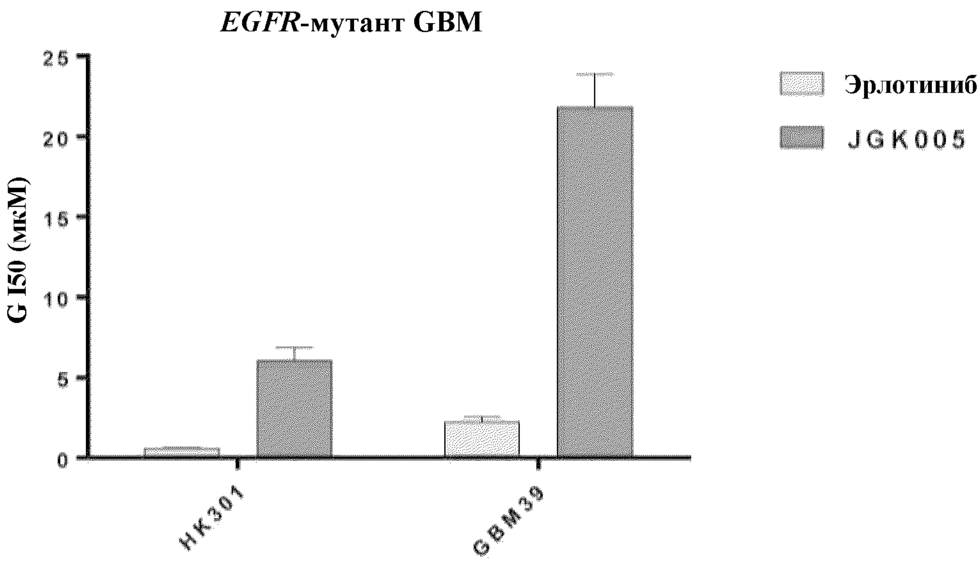
115. Способ по п. 114, в котором стадия очистки включает колоночную хроматографию, препаративную тонкослойную хроматографию или высокоэффективную жидкостную хроматографию.

По доверенности

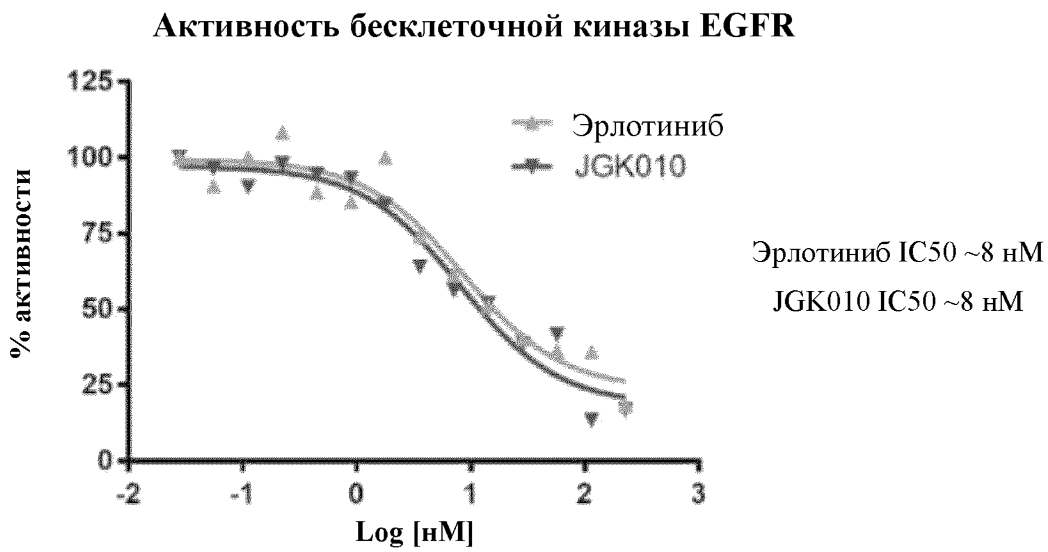
ФИГ. 1


Эрлотиниб PK (25 мг/кг)
Плазма крови
Головной мозг
Головной мозг/плазма крови AUC0-7: 7,6%
Плазма крови t1/2: 5,259 ч.
Головной мозг t1/2: 5,316 ч.
Эрлотиниб (мкМ)
Время (ч.)
JGK005 PK (10 мг/кг)
Плазма крови
Головной мозг
Головной мозг/плазма крови AUC0-7ч.: 61,1%
Плазма крови t1/2: 2,07 ч.
Головной мозг t1/2: 1,54 ч.
JGK005 (мкМ)
Время (ч.)
Головной мозг/плазма крови: 7,6%
Головной мозг/плазма крови: 61,1%

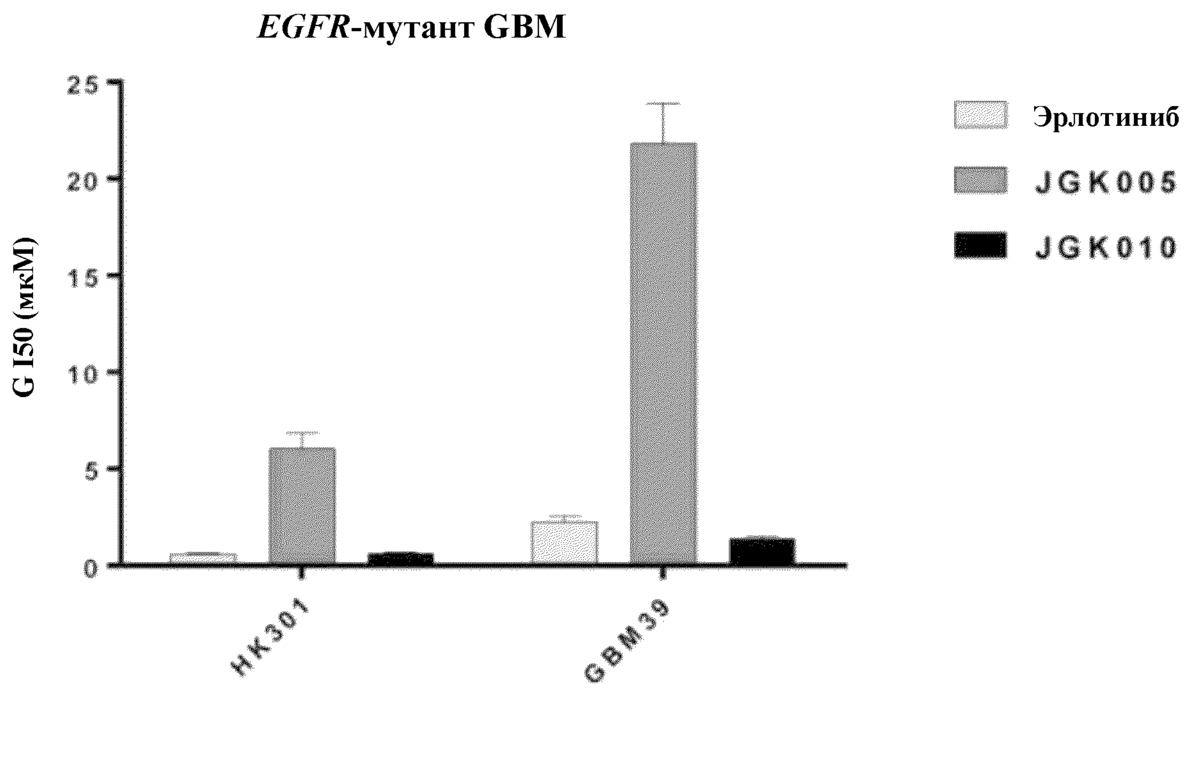
ФИГ. 2


EGFR-мутант GBM
Эрлотиниб
JGK005
G I50 (мкМ)
HK301
GBM39

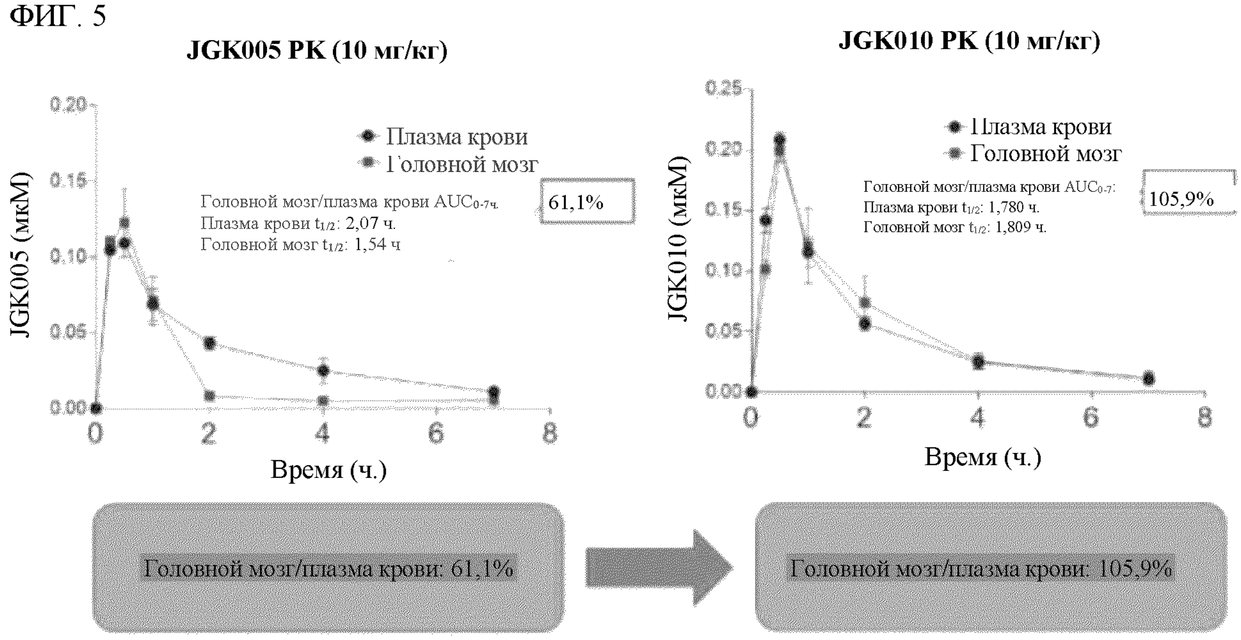
ФИГ. 3


Активность бесклеточной киназы EGFR
% активности
125
100
75
50
25
0
-2
-1
0
1
2
3
Log [нМ]
Эрлотиниб
JGK010
Эрлотиниб IC50 ~8 нМ
JGK010 IC50 ~8 нМ

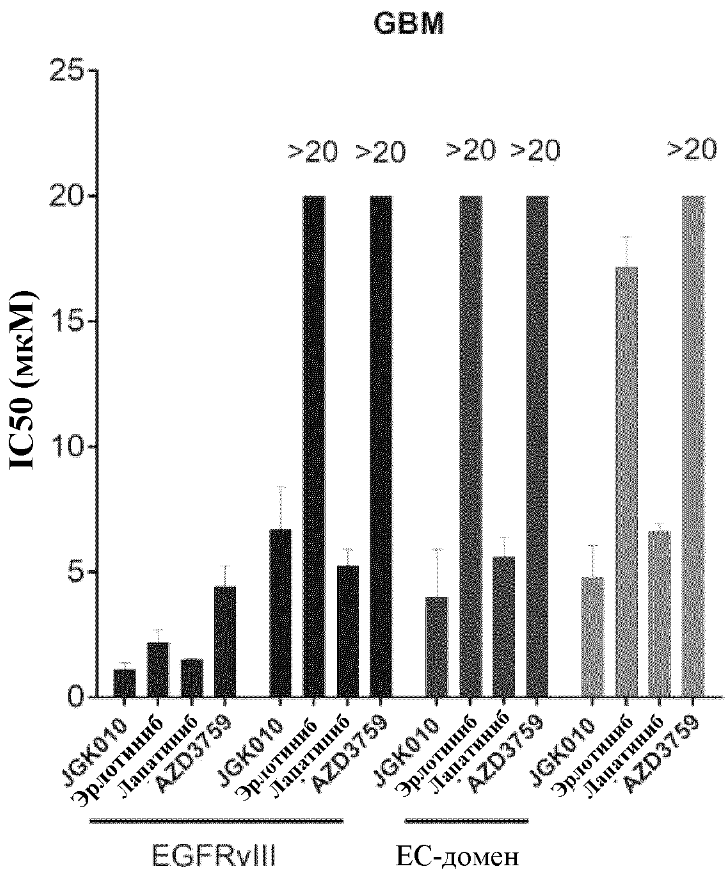
ФИГ. 4


EGFR-мутант GBM
G I50 (мкМ)
25
20
15
10
5
0
HK301
GBM39
Эрлотиниб
JGK005
JGK010

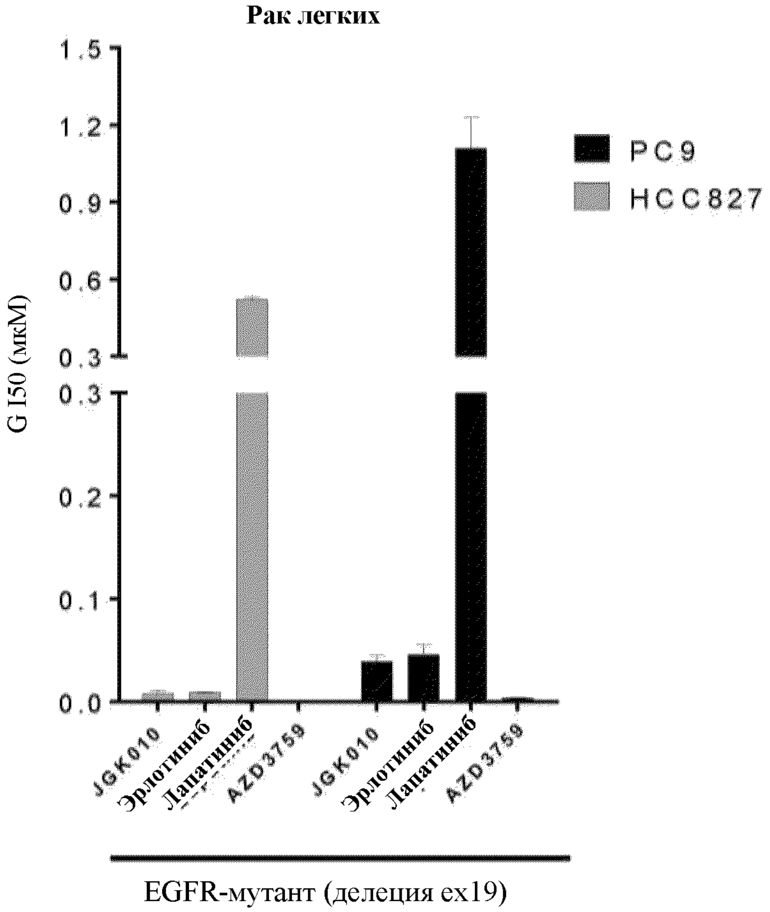
ФИГ. 5


JGK005 PK (10 мг/кг)
JGK010 PK (10 мг/кг)
Плазма крови
Головной мозг
Головной мозг/плазма крови AUC0-7ч.
61,1%
Плазма крови t1/2: 2,07 ч.
Головной мозг t1/2: 1,54 ч
Головной мозг/плазма крови AUC0-7:
105,9%
Плазма крови t1/2: 1,780 ч.
Головной мозг t1/2: 1,809 ч.
JGK005 (мкМ)
JGK010 (мкМ)
Время (ч.)
Головной мозг/плазма крови: 61,1%
Головной мозг/плазма крови: 105,9%

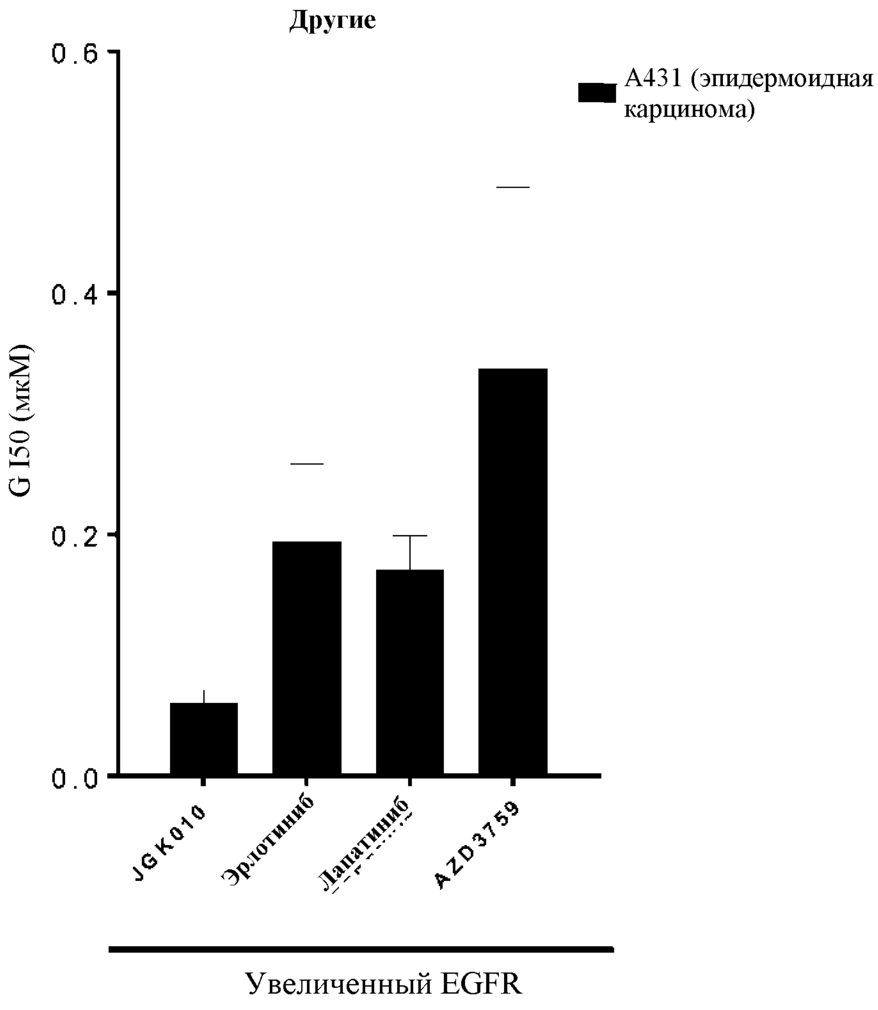
ФИГ. 6


GBM
IC50 (мкМ)
>20
JGK010
Эрлотиниб
Лапатиниб
AZD3759
EGFRvIII
EC-домен

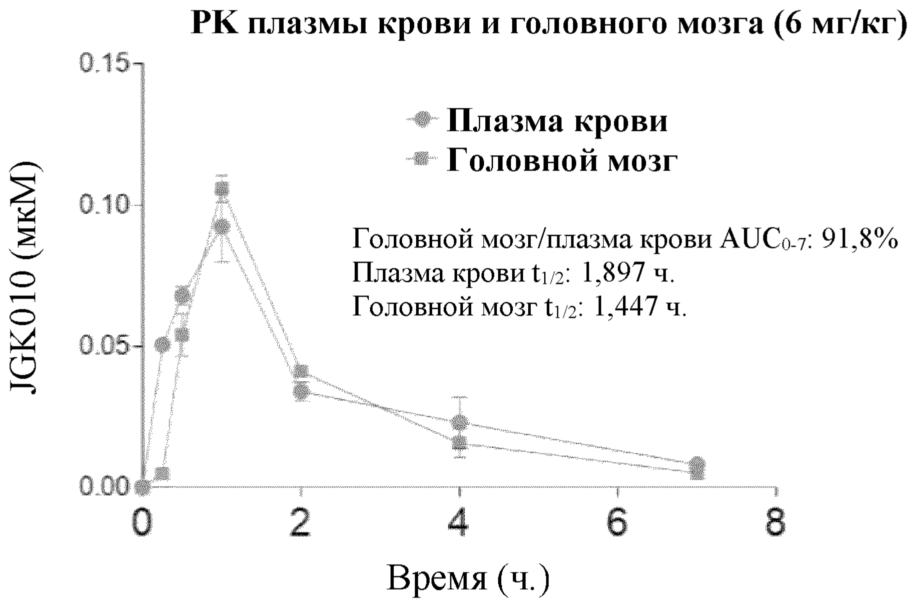
ФИГ. 7A


Рак легких
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.3
0.2
0.1
0.0
G I50 (мкМ)
PC9
HCC827
JGK010
Эрлотиниб
Лапатиниб
AZD3759
JGK010
Эрлотиниб
Лапатиниб
AZD3759
EGFR-мутант (делеция ex19)

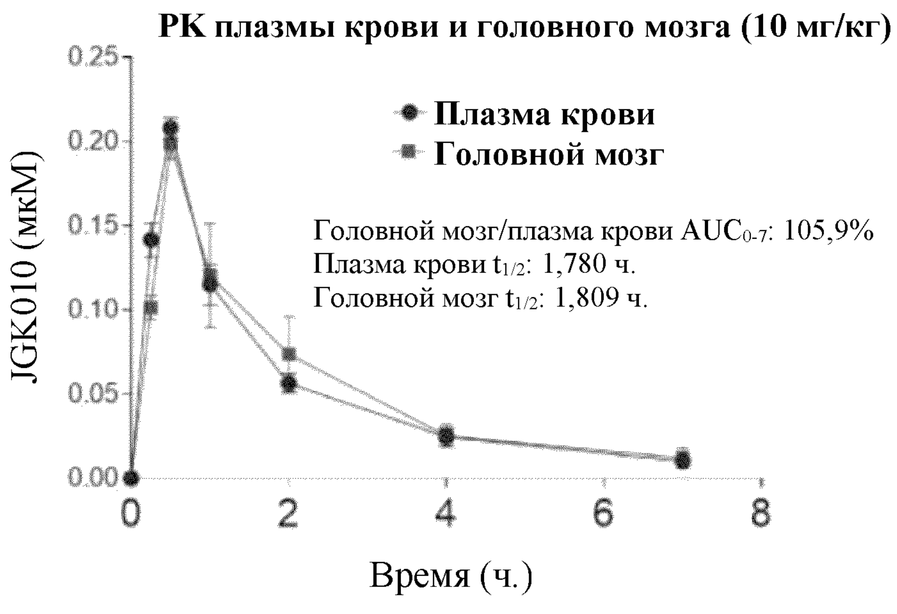
ФИГ. 7В


Другие
0.6
0.4
0.2
0.0
G I50 (мкМ)
A431 (эпидермоидная карцинома)
JGK010
Эрлотиниб
Лапатиниб
AZD3759
Увеличенный EGFR

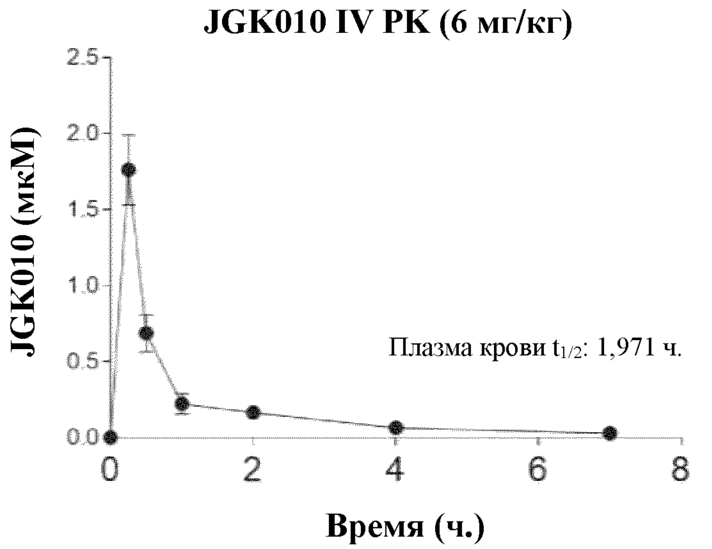
ФИГ. 8А


PK плазмы крови и головного мозга (6 мг/кг)
Плазма крови
Головной мозг
Головной мозг/плазма крови AUC_{0-7}: 91,8%
Плазма крови $t_{1/2}$: 1,897 ч.
Головной мозг $t_{1/2}$: 1,447 ч.
JGK010 (мкМ)
0.15
0.10
0.05
0.00
0
2
4
6
8
Время (ч.)

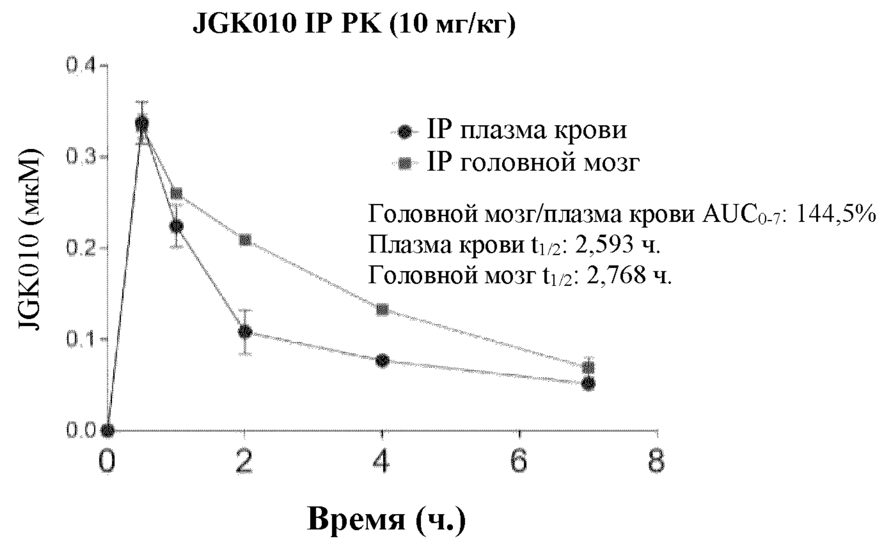
ФИГ. 8В.


PK плазмы крови и головного мозга (10 мг/кг)
Плазма крови
Головной мозг
Головной мозг/плазма крови AUC_{0-7}: 105,9%
Плазма крови $t_{1/2}$: 1,780 ч.
Головной мозг $t_{1/2}$: 1,809 ч.
JGK010 (мкМ)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
2
4
6
8
Время (ч.)

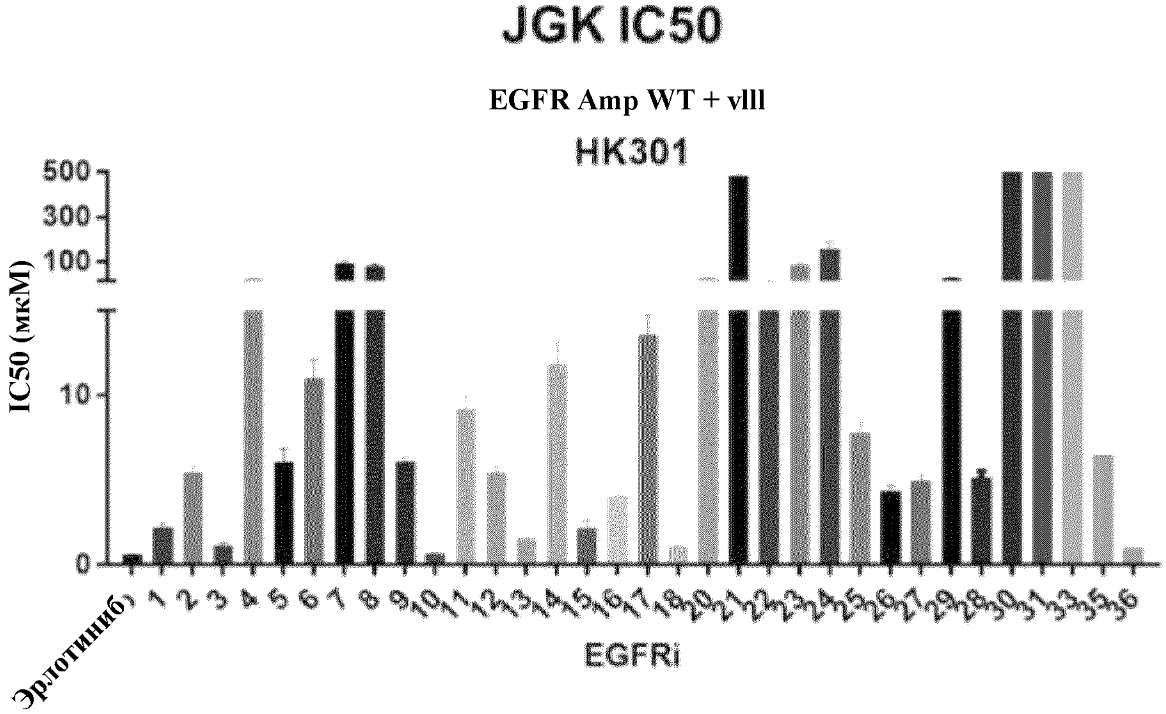
ФИГ. 8C


JGK010 IV PK (6 мг/кг)
JGK010 (мкМ)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
8
Время (ч.)
Плазма крови $t_{1/2}$: 1,971 ч.

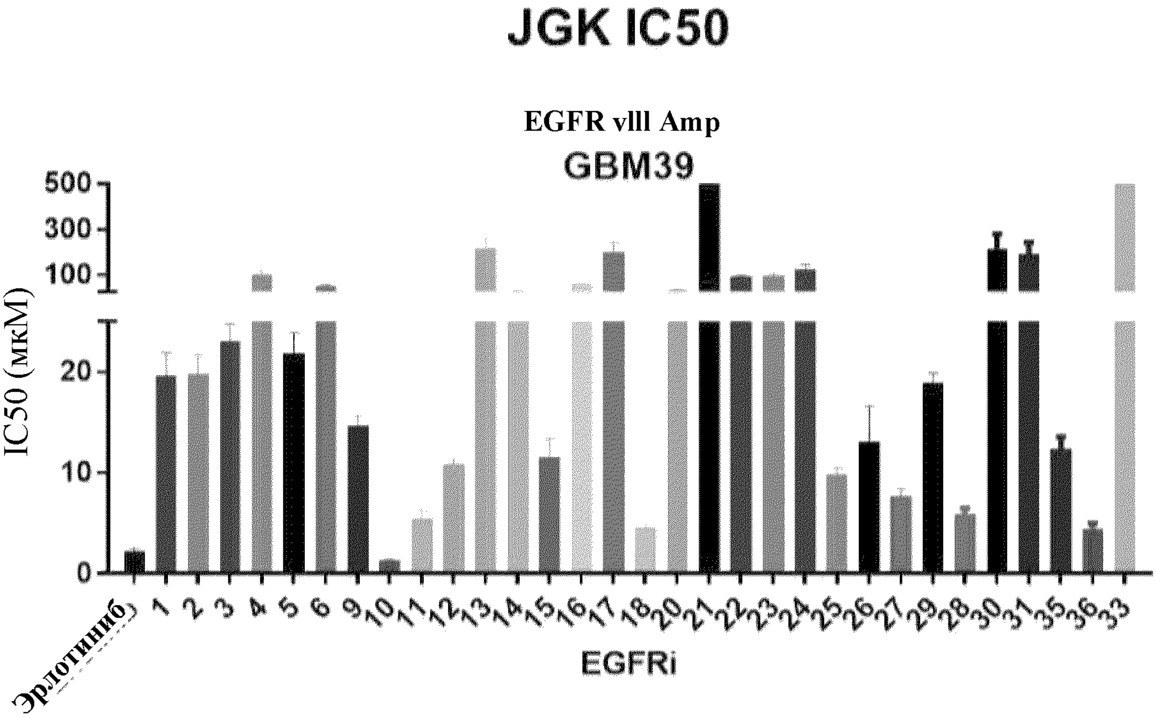
ФИГ. 8D


JGK010 IP PK (10 мг/кг)
JGK010 (мкМ)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
2
4
6
8
Время (ч.)
IP плазма крови
IP головной мозг
Головной мозг/плазма крови AUC_{0-7}: 144,5%
Плазма крови $t_{1/2}$: 2,593 ч.
Головной мозг $t_{1/2}$: 2,768 ч.

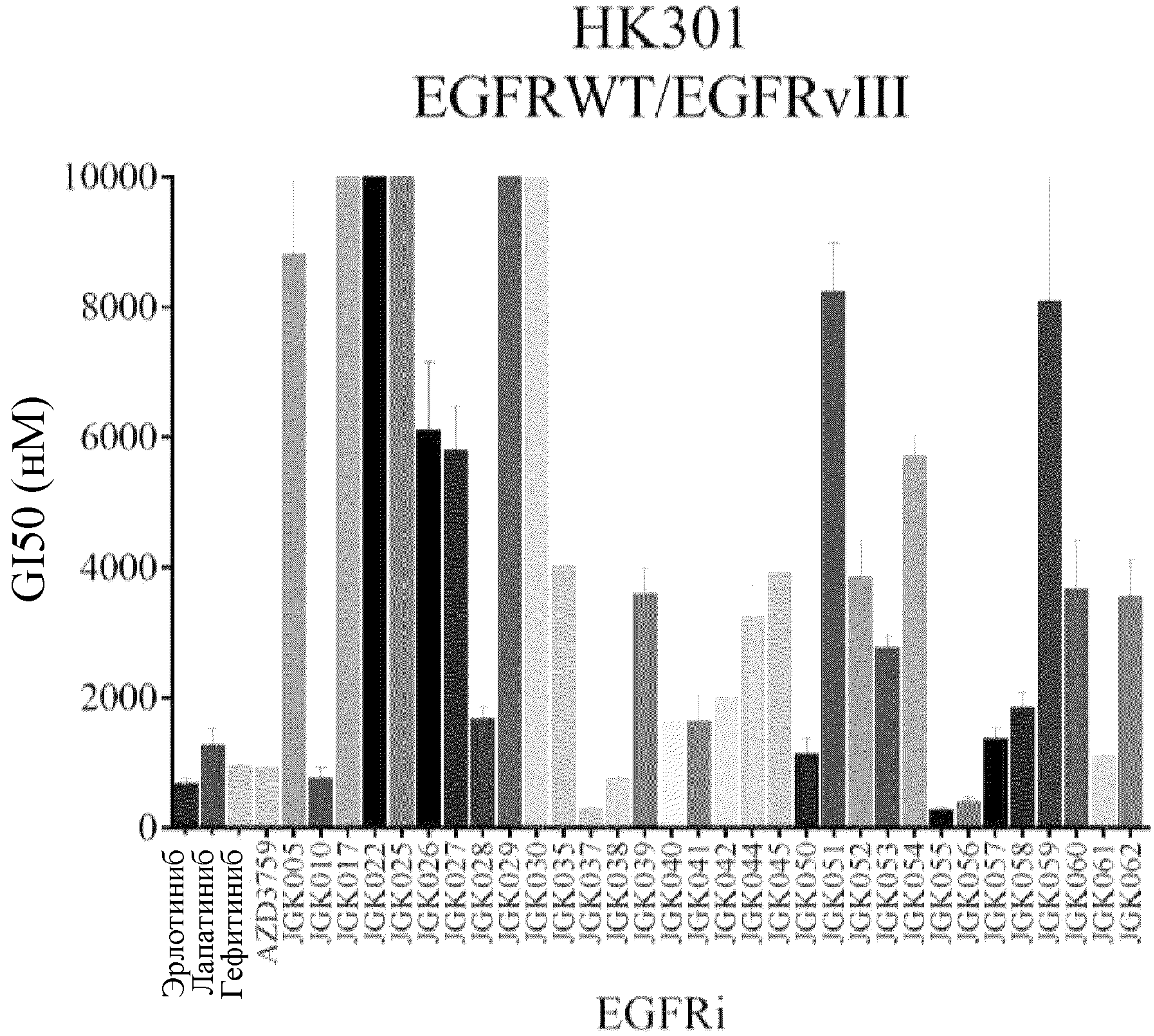
ФИГ. 9


JGK IC50
EGFR Amp WT + vIII
HK301
IC50 (мкМ)
500
300
100
10
0
Эрлотиниб
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 20 21 22 23 24 25 26 27 29 28 30 31 33 35 36
EGFRi

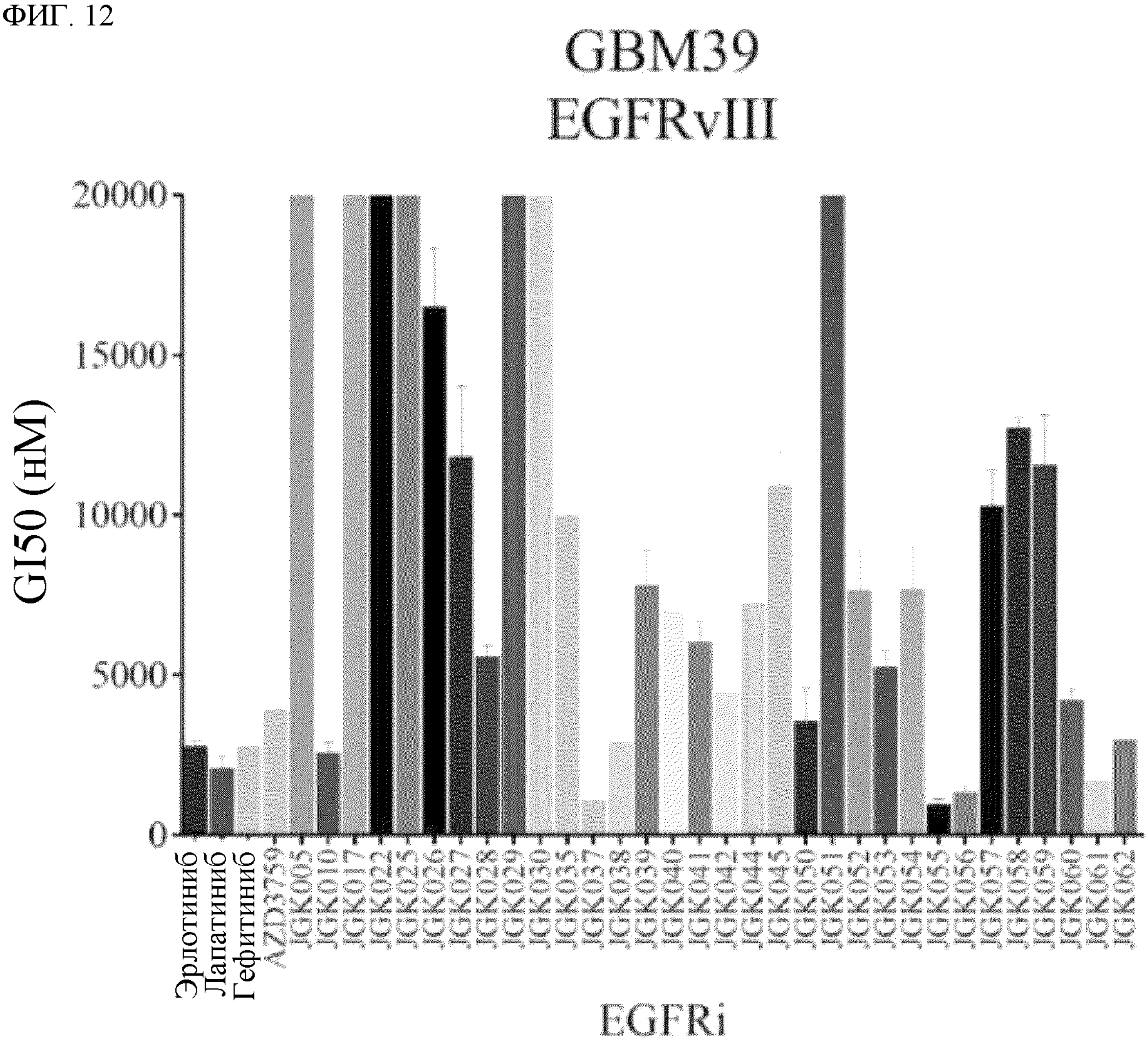
ФИГ. 10


JGK IC50
EGFR vIII Amp
GBM39
IC50 (мкМ)
500
300
100
20
10
0
Эрлотиниб
1 2 3 4 5 6 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 20 21 22 23 24 25 26 27 29 28 30 31 35 36 33
EGFRi

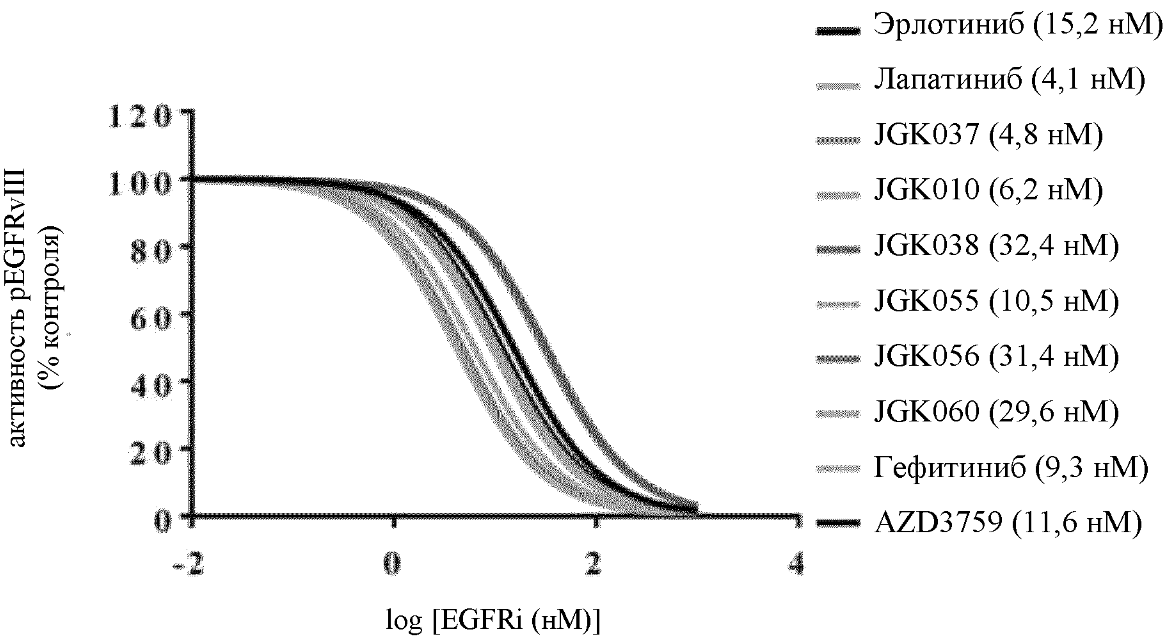
ФИГ. 11


HK301
EGFRWT/EGFRvIII
GI50 (нМ)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Эрлотиниб
Лапатиниб
Гефитиниб
AZD3759
JGK005
JGK010
JGK017
JGK022
JGK025
JGK026
JGK027
JGK028
JGK029
JGK030
JGK035
JGK037
JGK038
JGK039
JGK040
JGK041
JGK042
JGK044
JGK045
JGK050
JGK051
JGK052
JGK053
JGK054
JGK055
JGK056
JGK057
JGK058
JGK059
JGK060
JGK061
JGK062
EGFRi

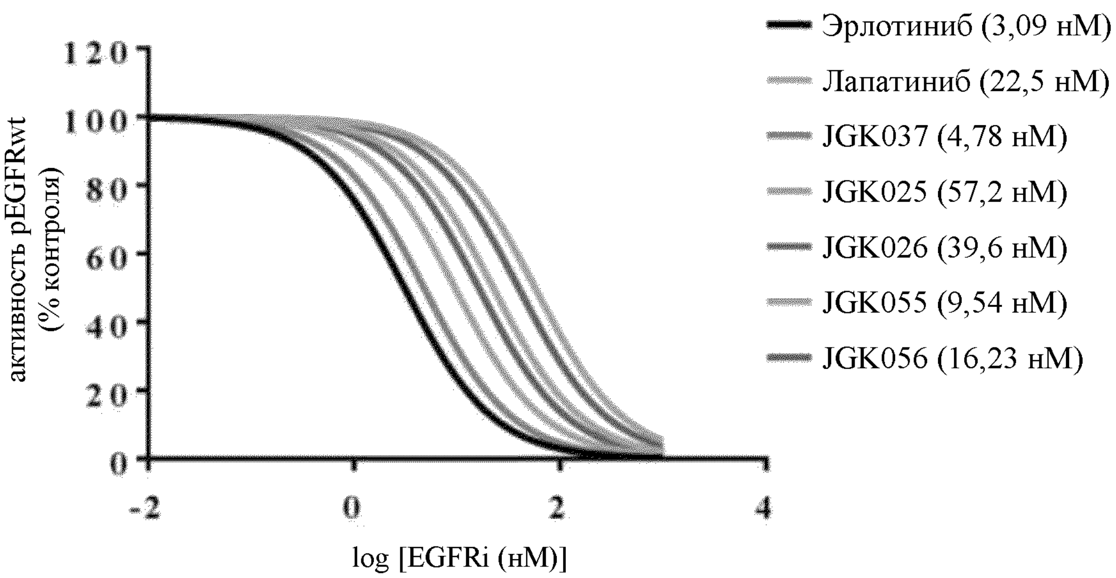
ФИГ. 12


GBM39
EGFRvIII
GI50 (нМ)
20000
15000
10000
5000
0
Эрлотиниб
Лапатиниб
Гефитиниб
AZD3759
JGK005
JGK010
JGK017
JGK022
JGK023
JGK026
JGK027
JGK028
JGK029
JGK030
JGK035
JGK037
JGK038
JGK039
JGK040
JGK041
JGK042
JGK044
JGK045
JGK050
JGK051
JGK052
JGK053
JGK054
JGK055
JGK056
JGK057
JGK058
JGK059
JGK060
JGK061
JGK062
EGFRi

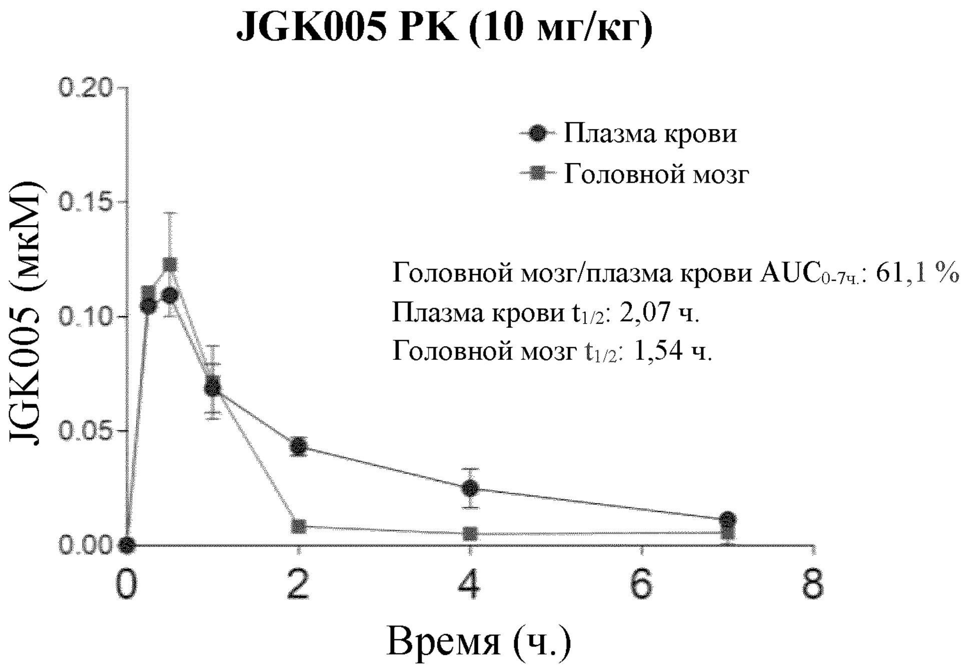
ФИГ. 13A



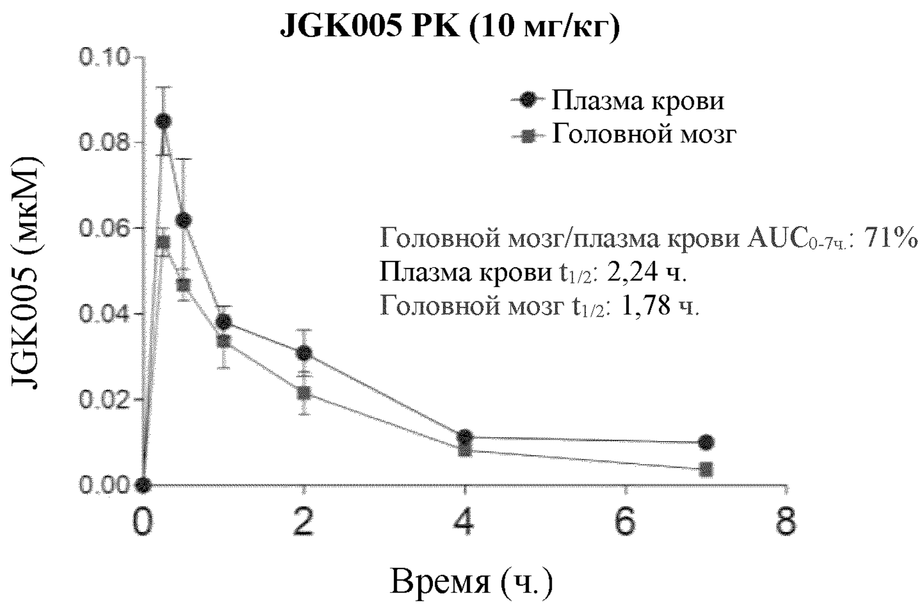
ФИГ. 13B



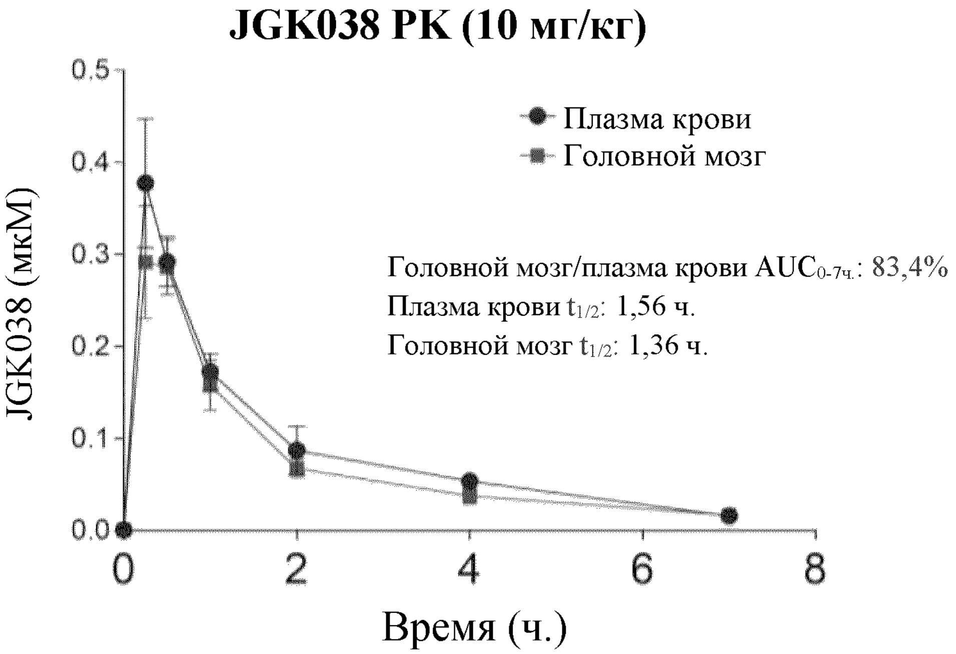
ФИГ. 14A



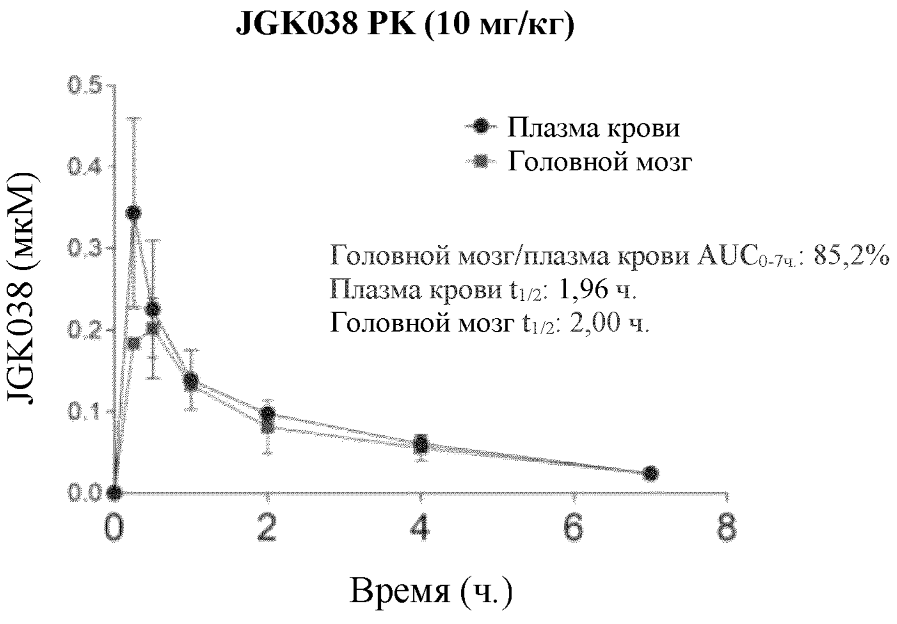
ФИГ. 14B



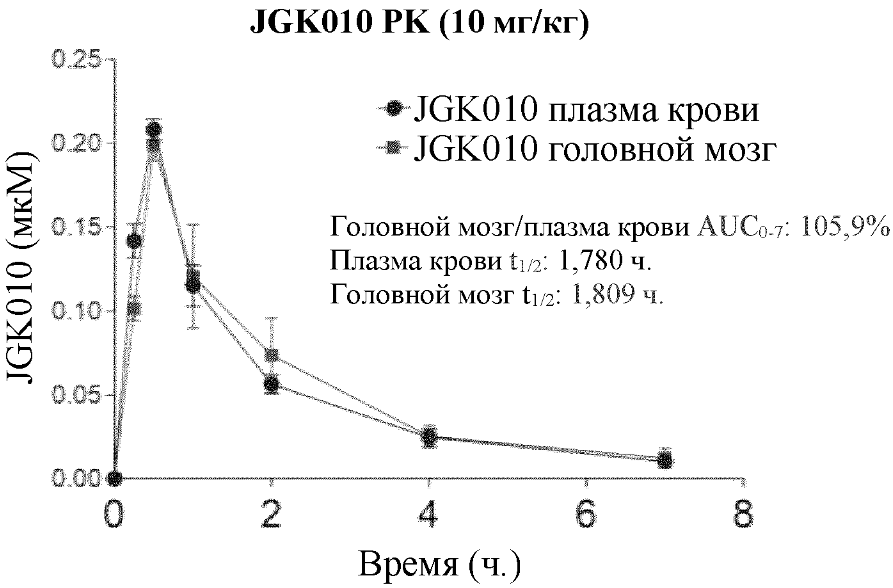
ФИГ. 15A



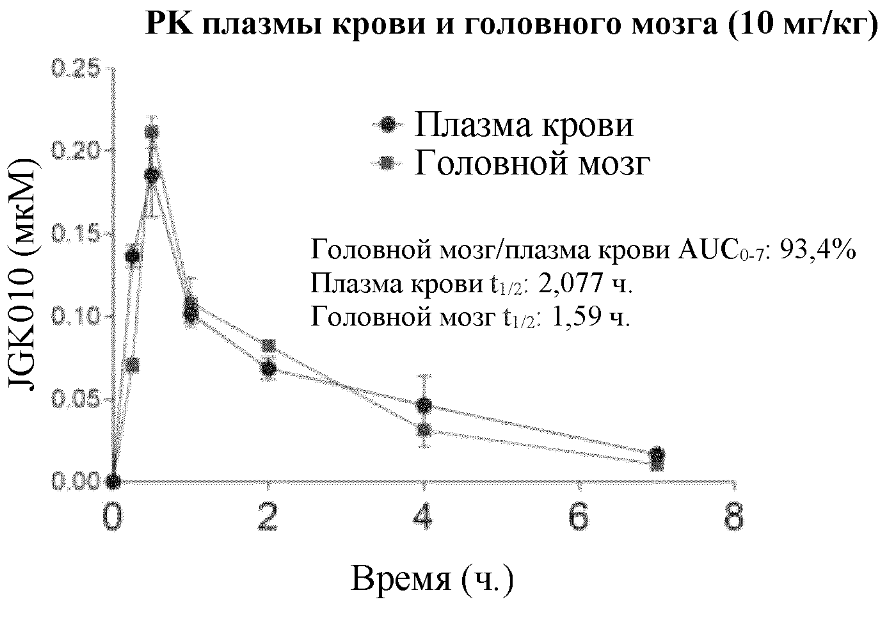
ФИГ. 15B



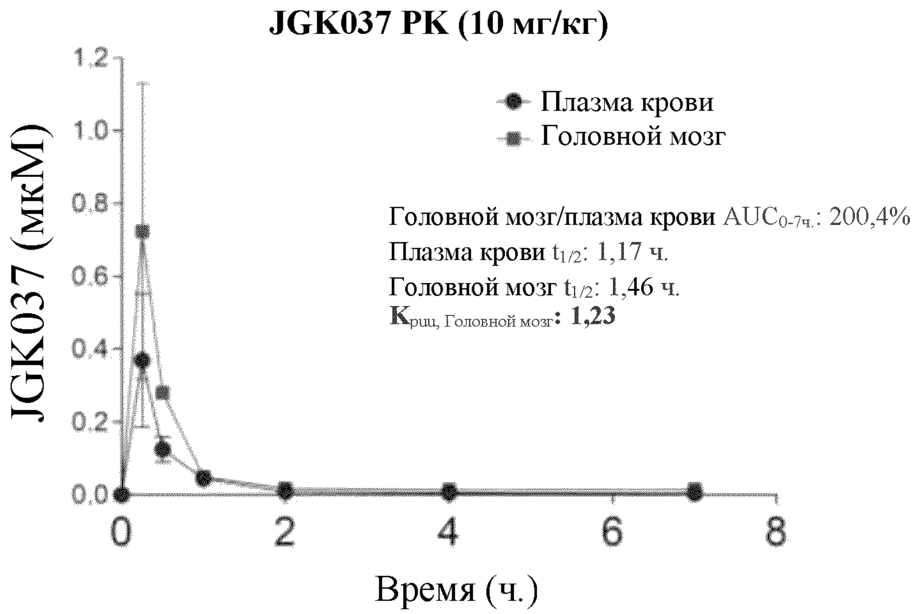
ФИГ. 16А



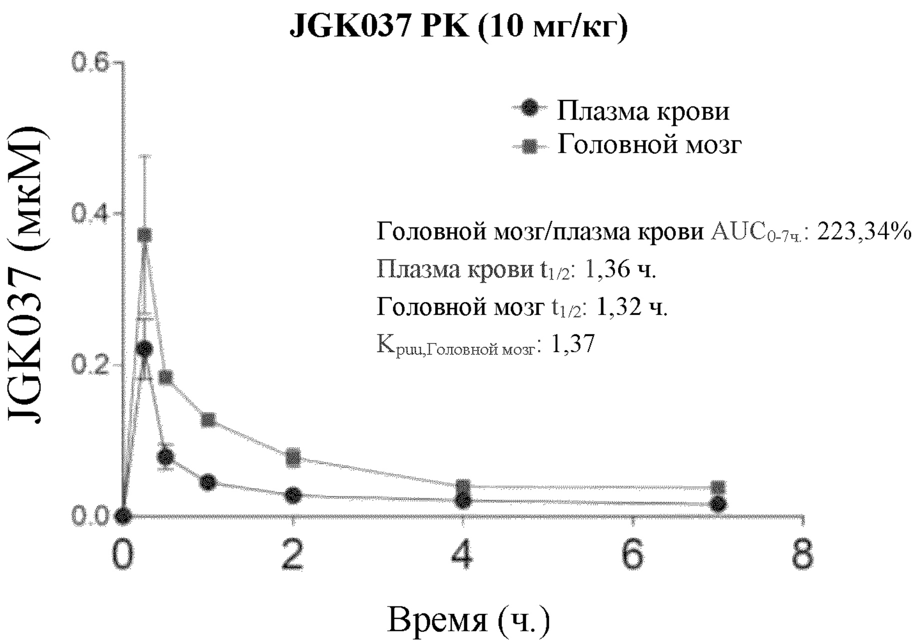
ФИГ. 16В



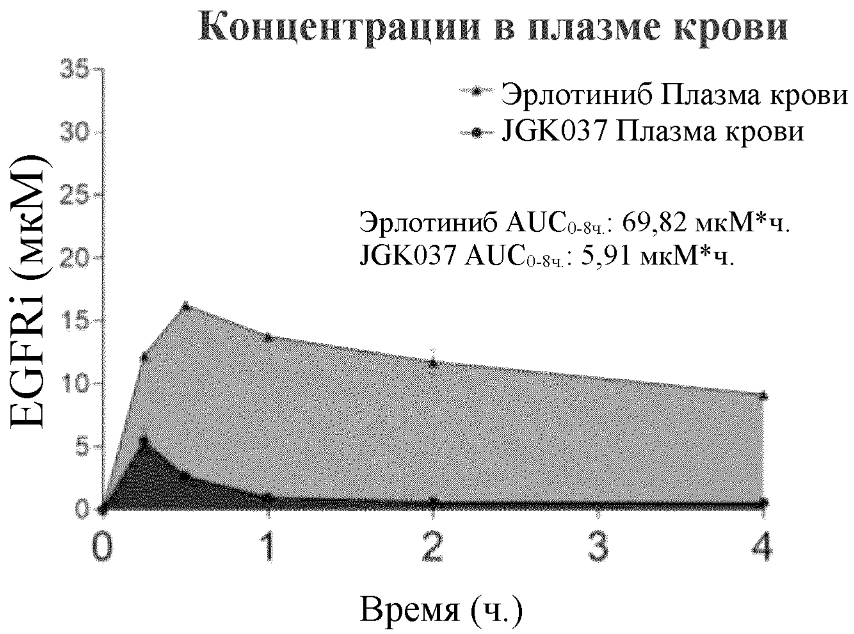
ФИГ. 17А



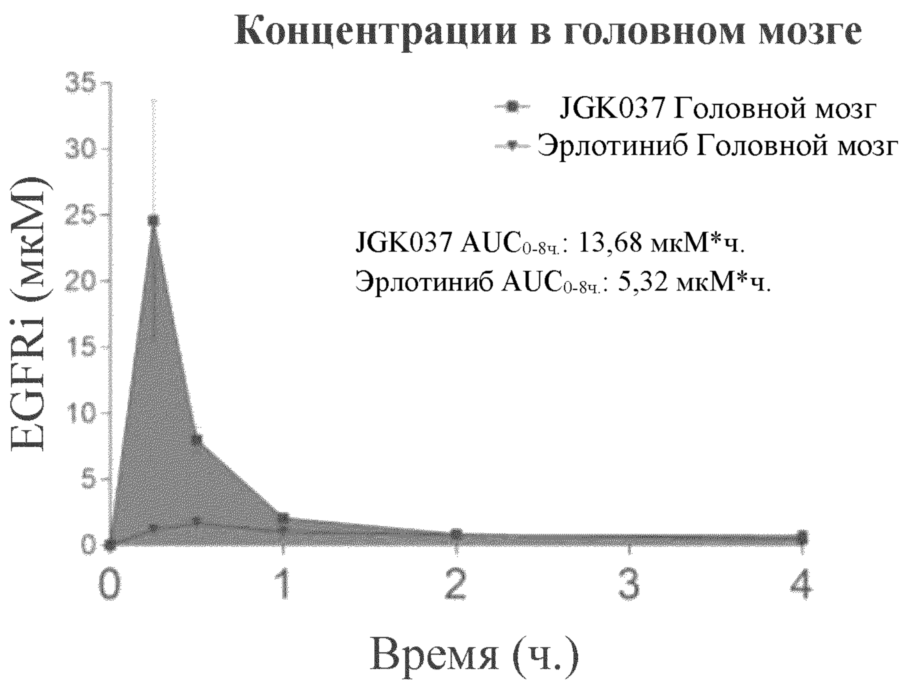
ФИГ. 17В



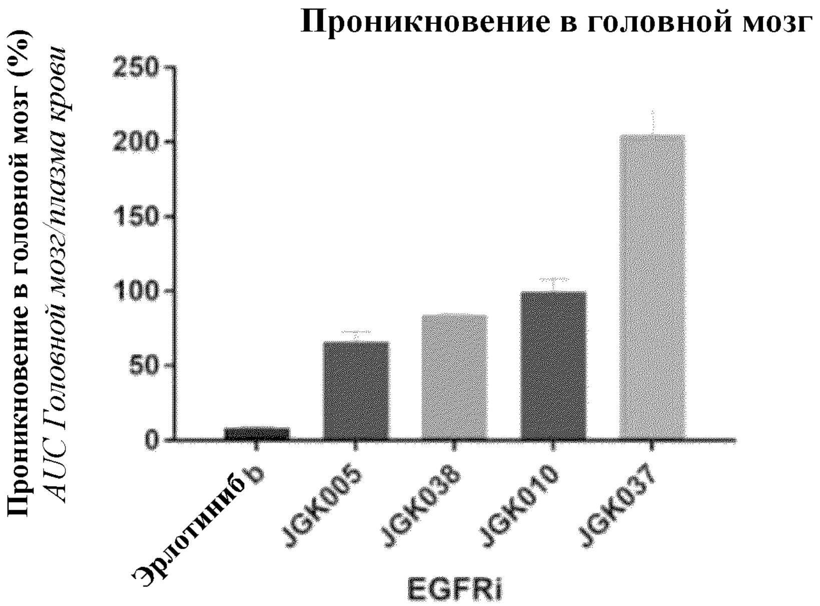
ФИГ. 18A



ФИГ. 18B

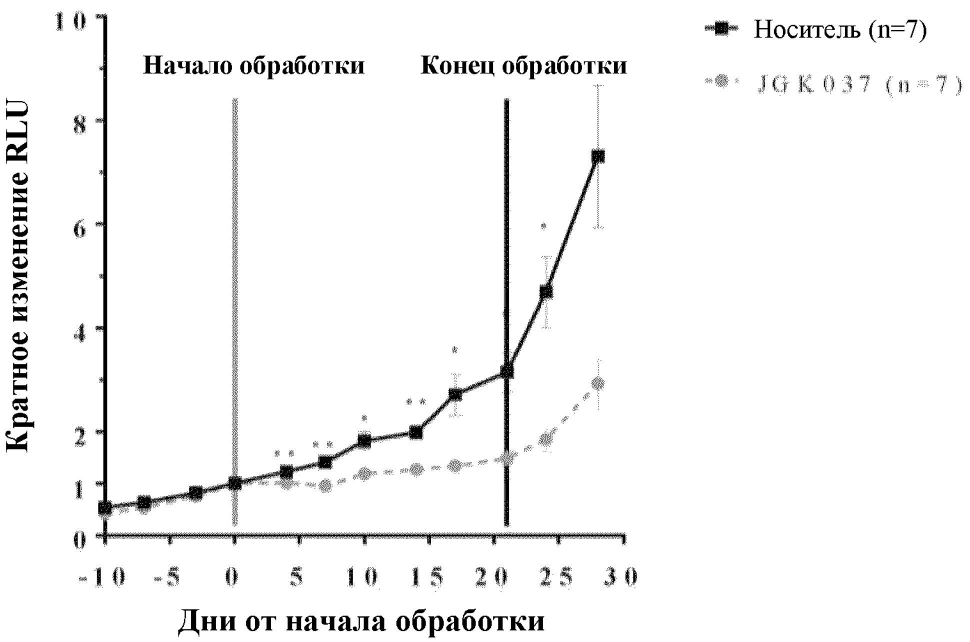


ФИГ. 19



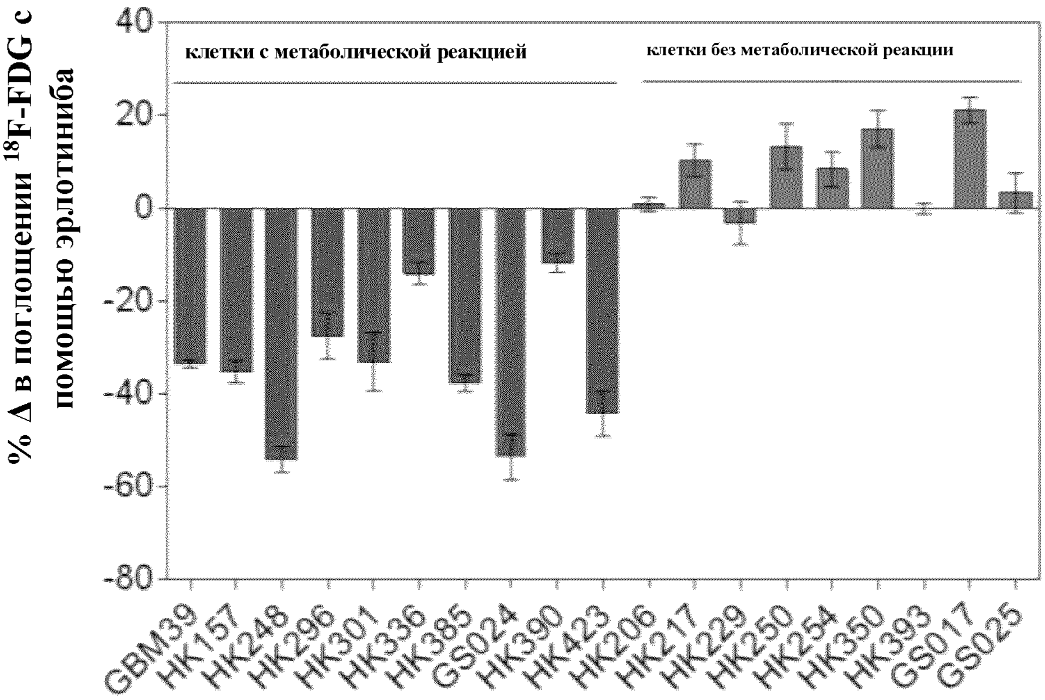
Проникновение в головной мозг
Проникновение в головной мозг (%)
AUC Головной мозг/плазма крови
250
200
150
100
50
0
Эрлотиниб
JGK005
JGK038
JGK010
JGK037
EGFRi

ФИГ. 20



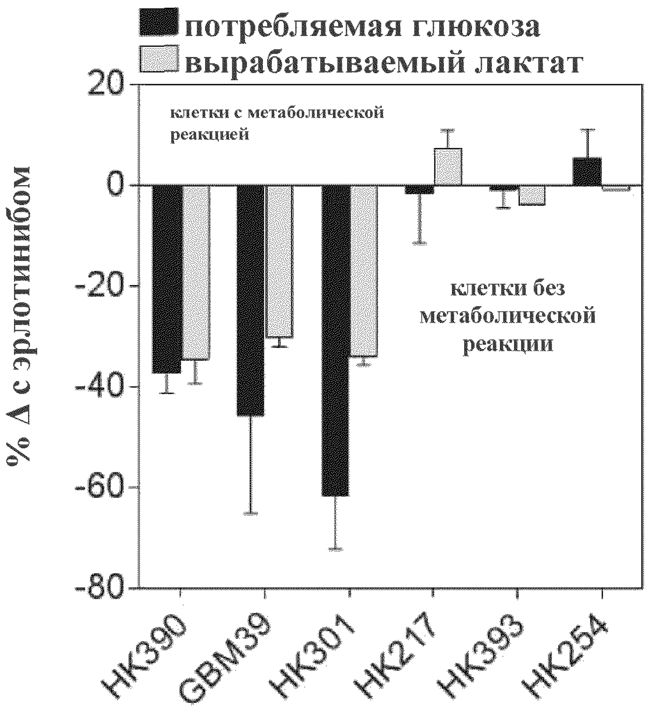
Начало обработки
Конец обработки
Носитель (n=7)
JGK037 (n=7)
Кратное изменение RLU
10
8
6
4
2
1
0
-10
-5
0
5
10
15
20
25
30
Дни от начала обработки

ФИГ. 21А

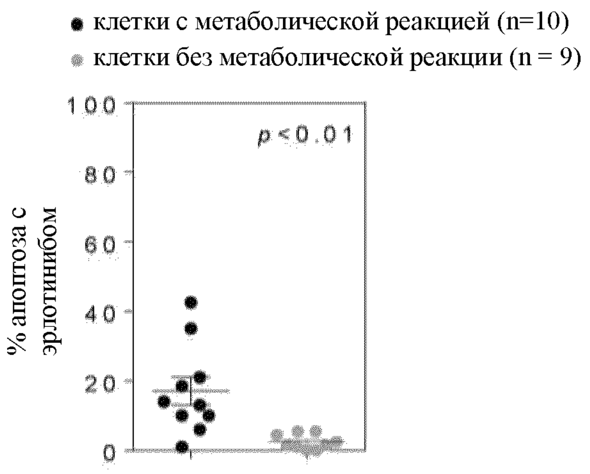


% Δ в поглощении 18F-FDG с помощью эрлотиниба
клетки с метаболической реакцией
клетки без метаболической реакции
40
20
0
-20
-40
-60
-80
GBM39
HK157
HK248
HK296
HK301
HK336
HK385
GS024
HK390
HK423
HK206
HK217
HK229
HK250
HK254
HK350
HK393
GS017
GS025

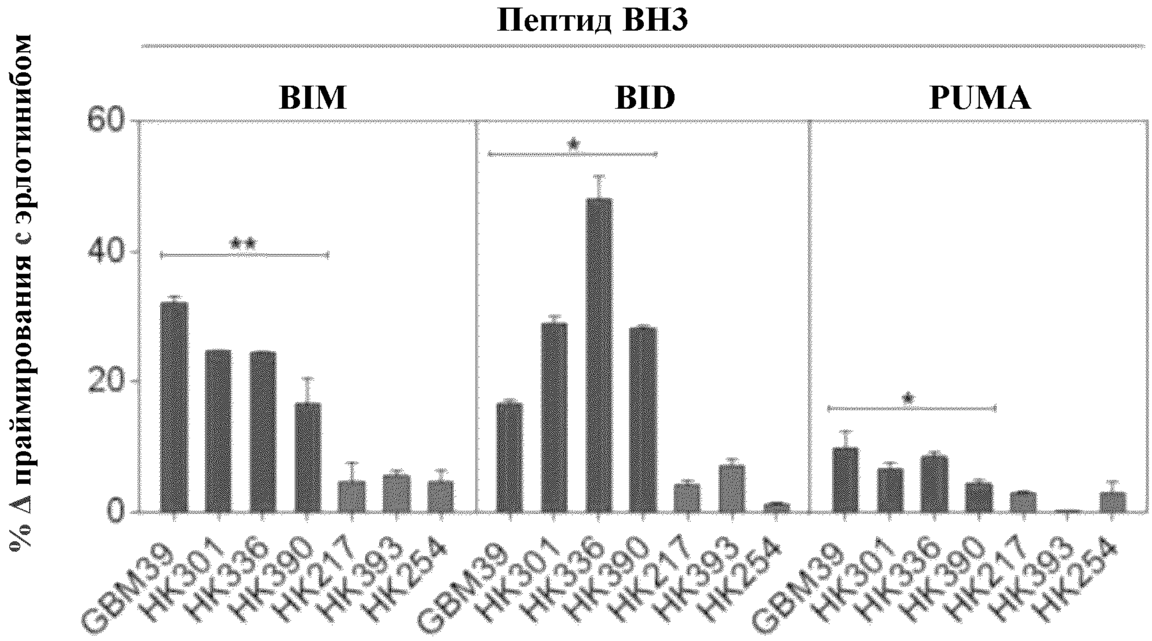
ФИГ. 21B



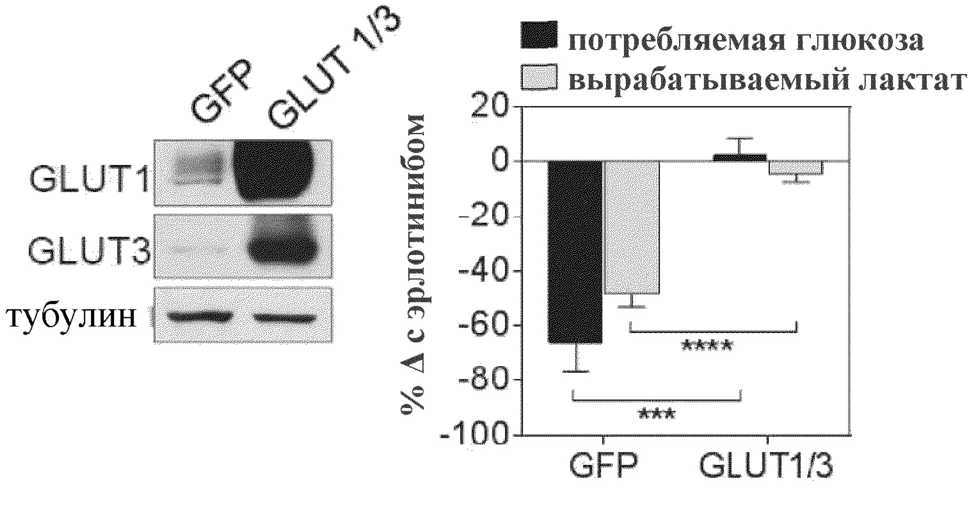
ФИГ. 21C



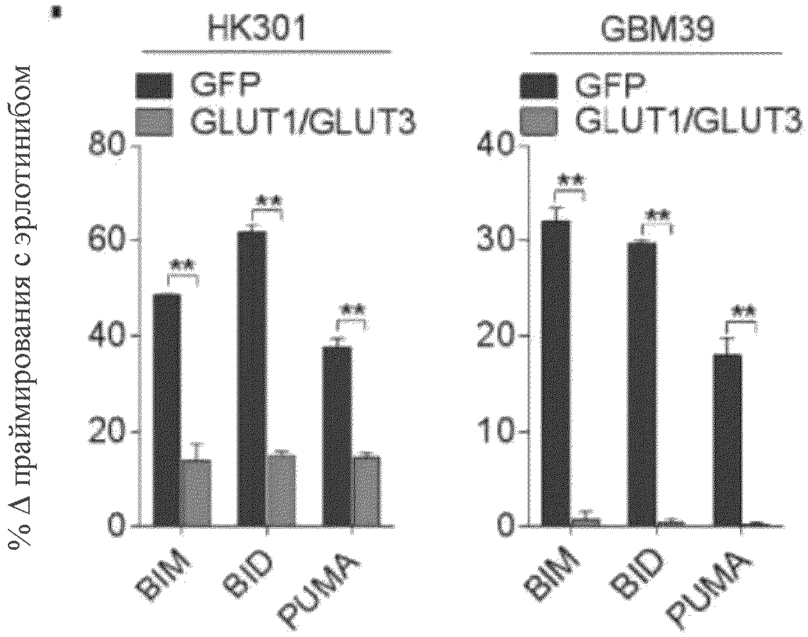
ФИГ. 21D



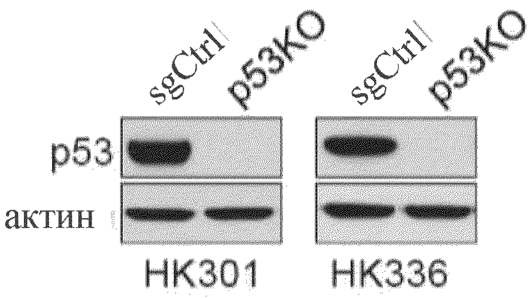
ФИГ. 21E



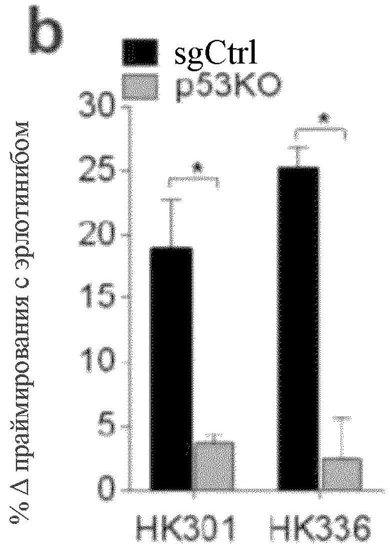
ФИГ. 21F



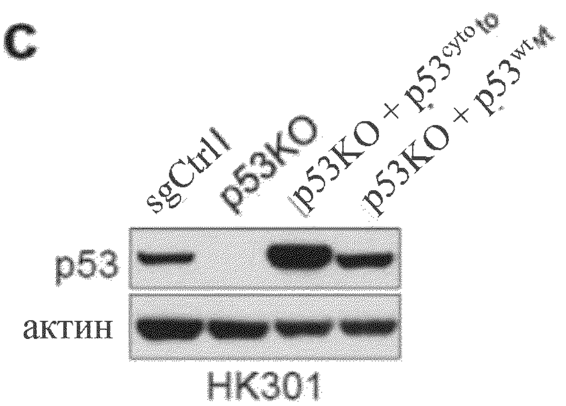
ФИГ. 22A



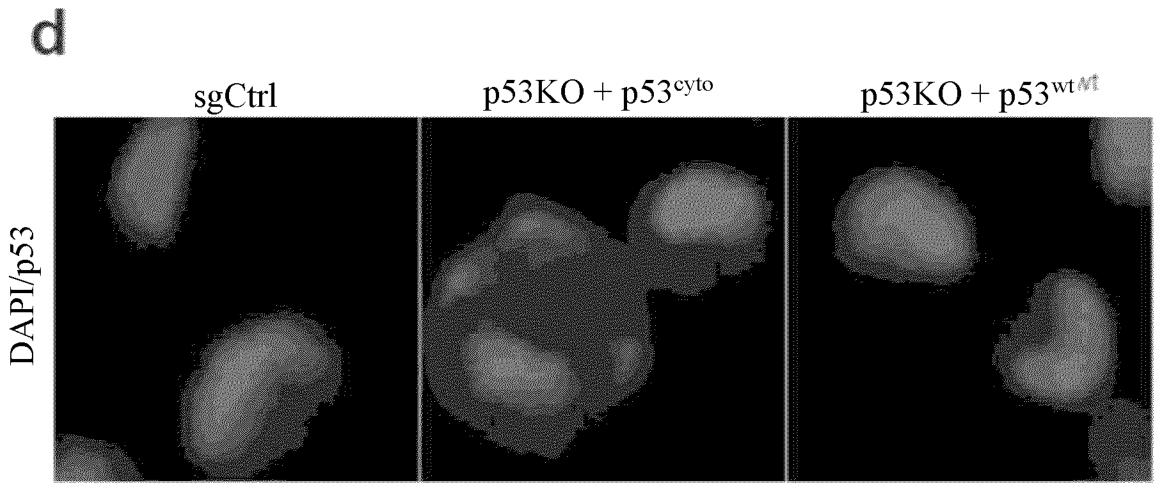
ФИГ. 22B



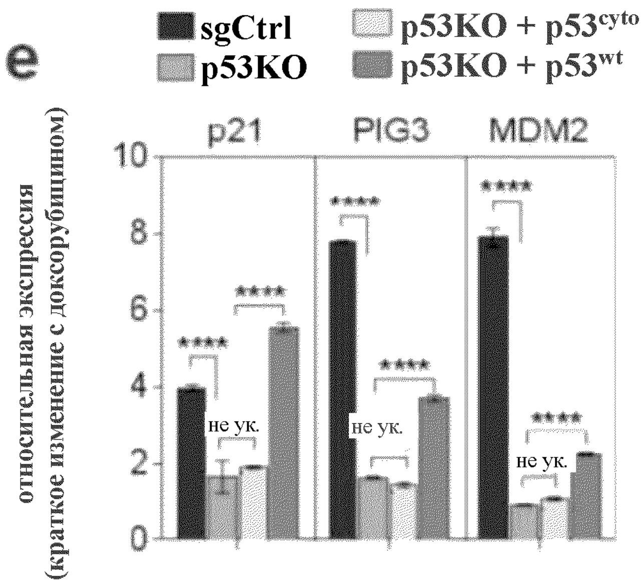
ФИГ. 22C



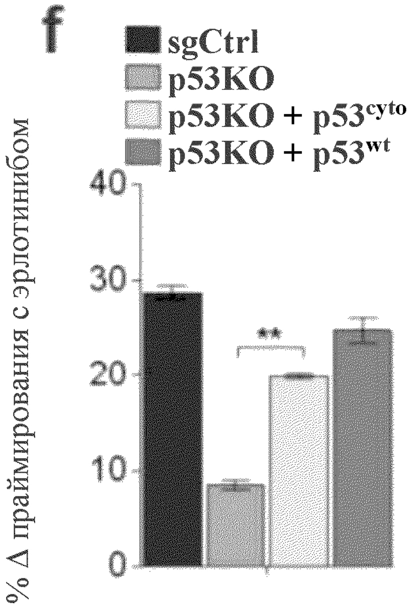
ФИГ. 22D



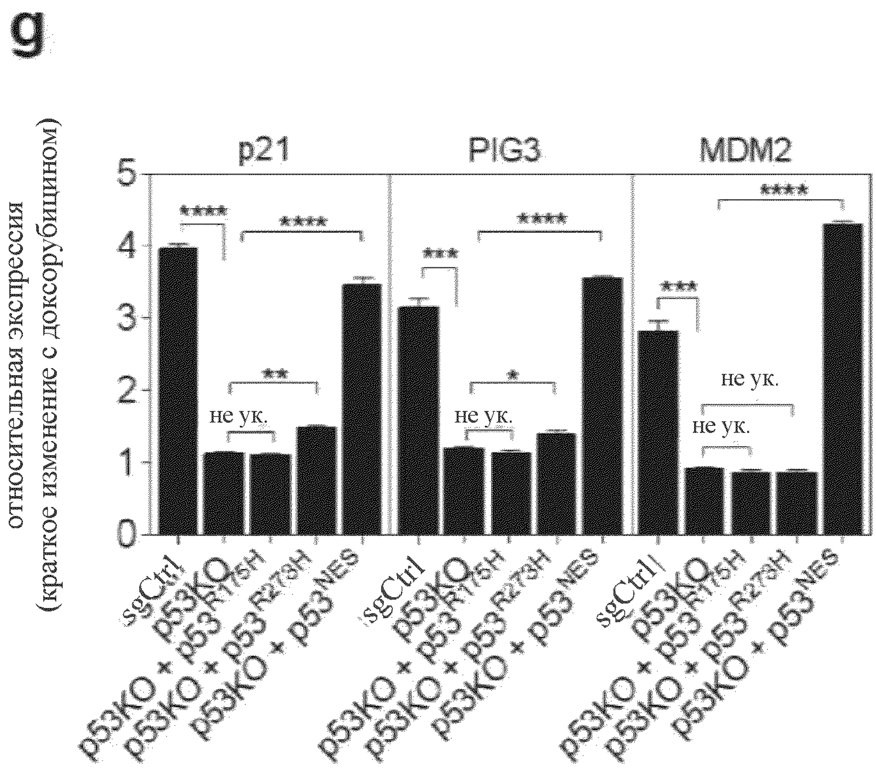
ФИГ. 22E



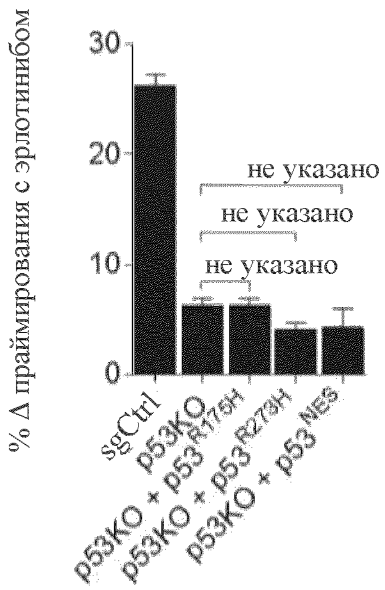
ФИГ. 22F



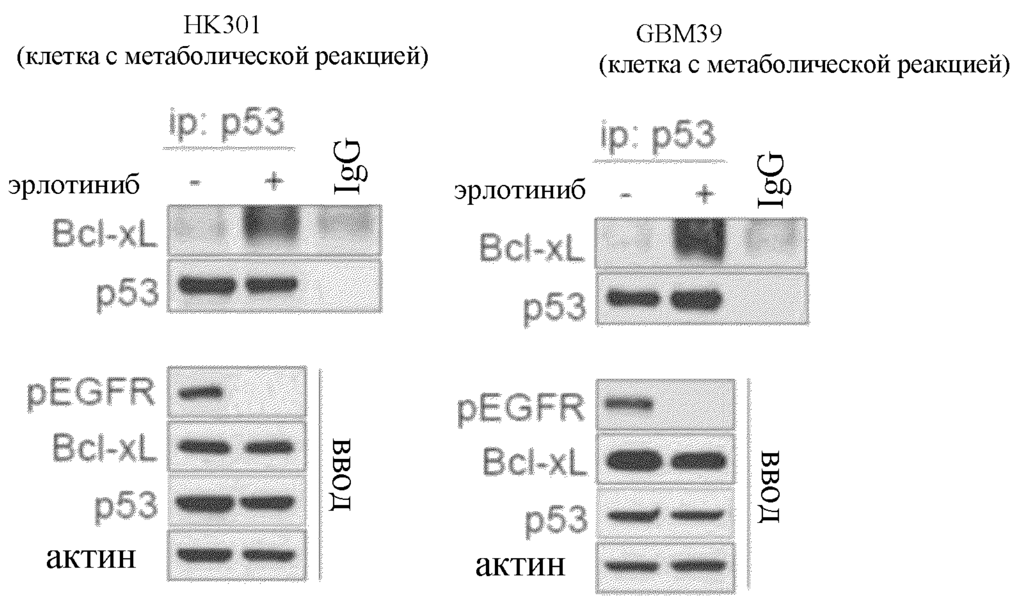
ФИГ. 22G



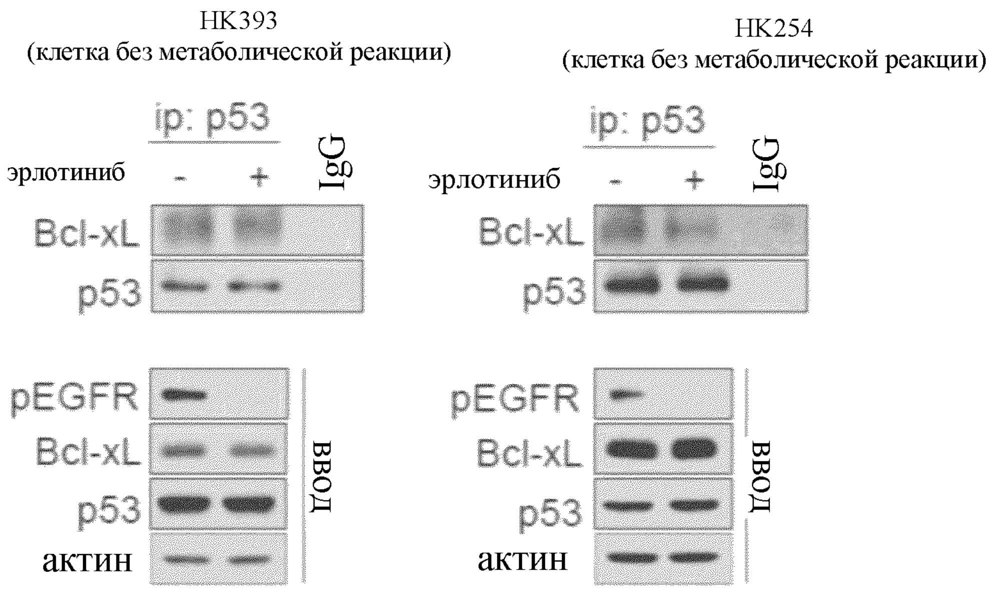
ФИГ. 22H



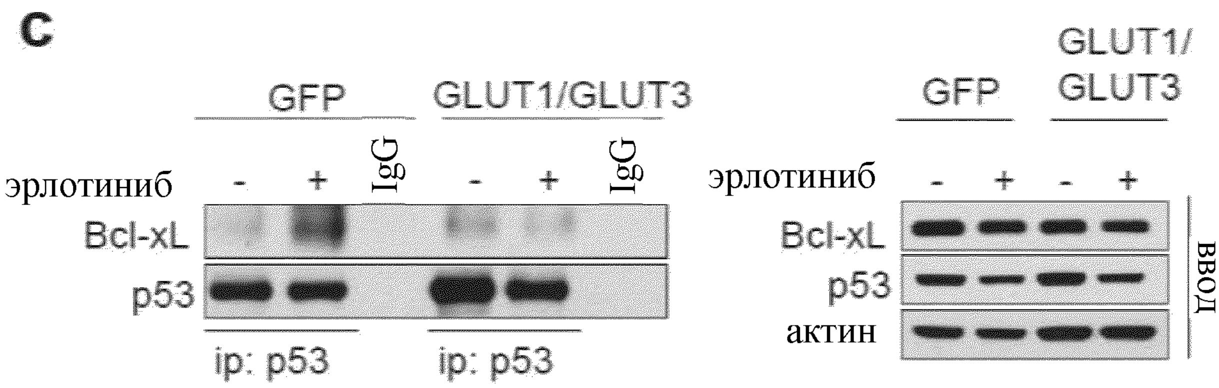
ФИГ. 23A



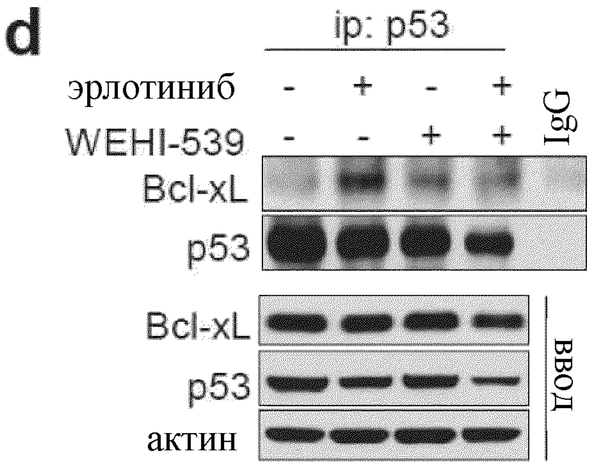
ФИГ. 23B



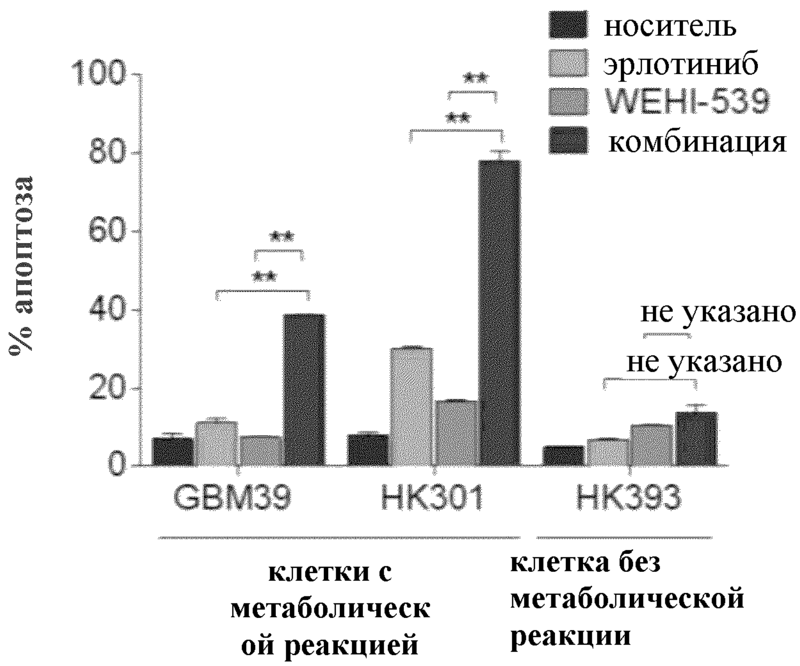
ФИГ. 23C



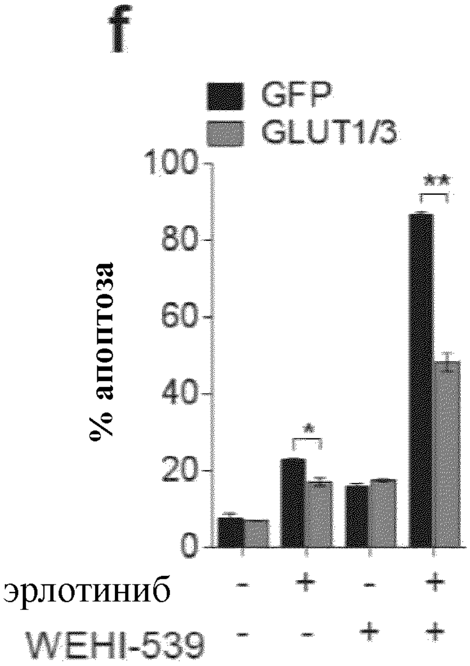
ФИГ. 23D



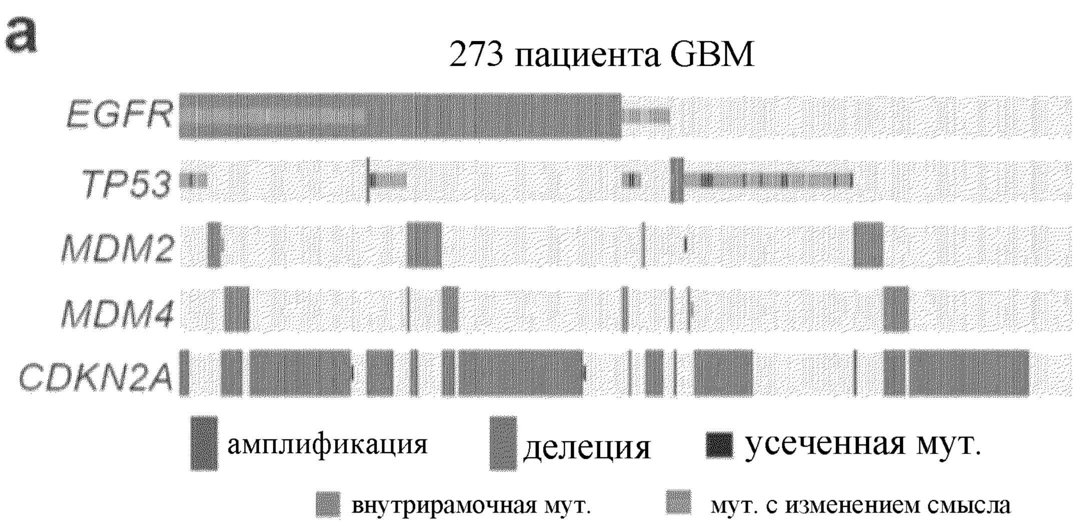
ФИГ. 23E



ФИГ. 23F



ФИГ. 24A

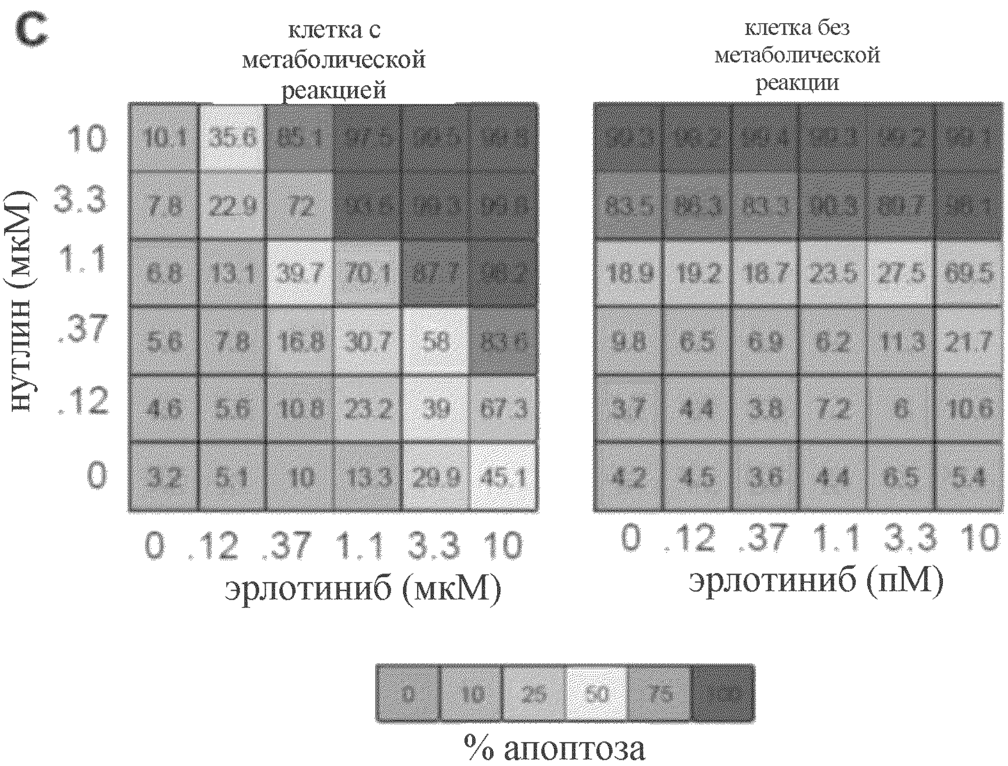


ФИГ. 24B

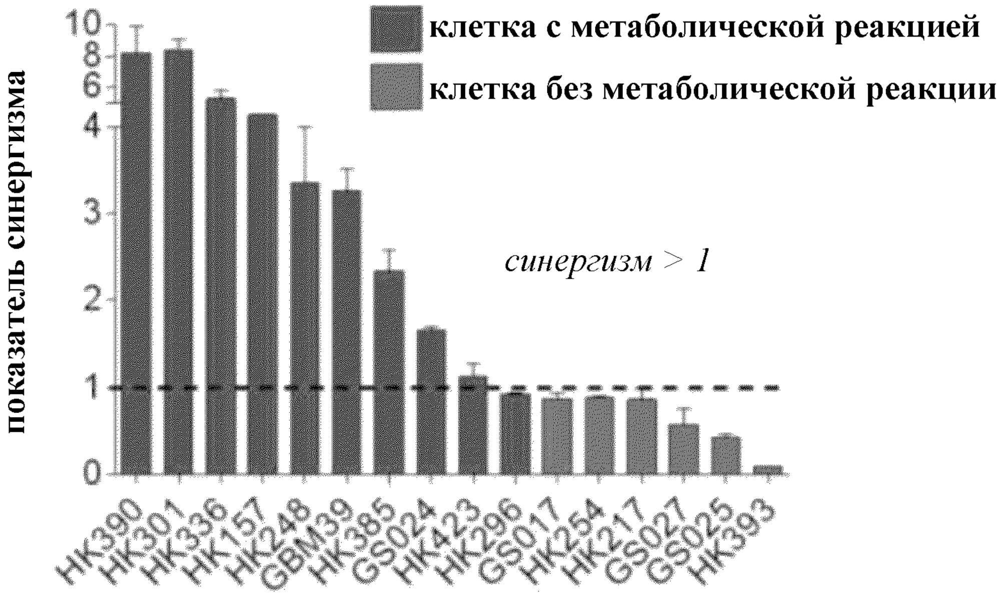
ГЕН A	ГЕН B	P-ЗНАЧЕНИЕ	ЛОГАРИФМ ОТНОШЕНИЯ ШАНСОВ	СВЯЗЫВАНИЕ
EGFR	*TP53*	<0,001	-1,383	Мут. Искл.
MDM2	*TP53*	<0,001	-2,547	Мут. Искл.
CDKN2A	*TP53*	<0,001	-1,403	Мут. Искл.
EGFR	*CDKN2A*	0,004	,703	Совместная встречаемость
MDM2	*CDK2NA*	<0,001	-2,138	Мут. Искл.

Показаны только важные взаимодействия

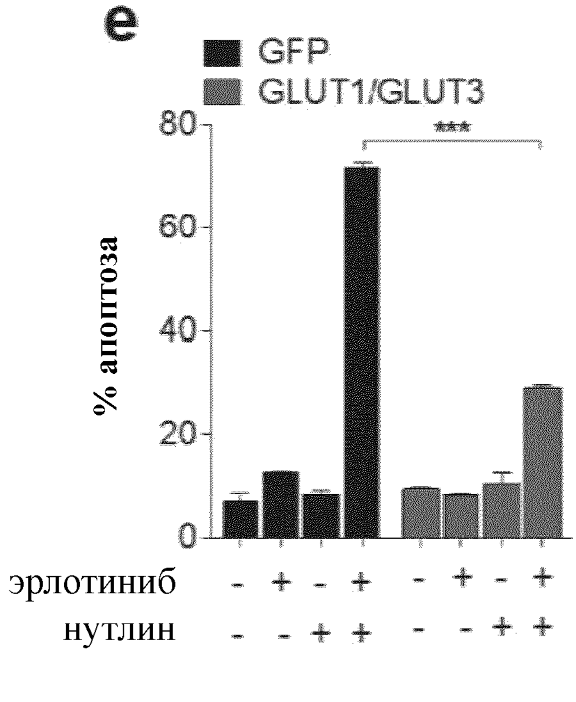
ФИГ. 24C



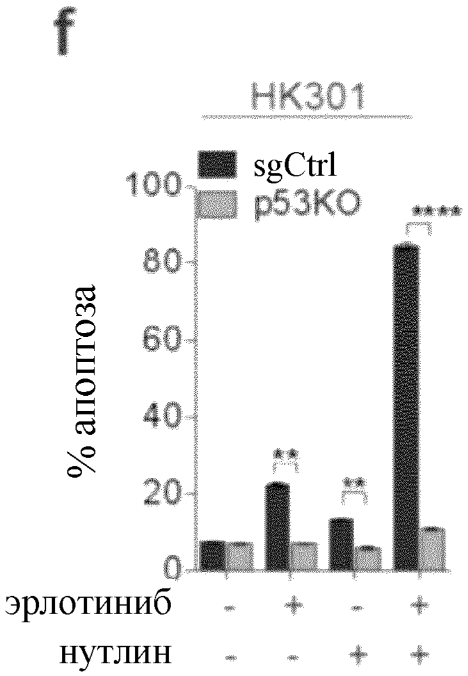
ФИГ. 24D



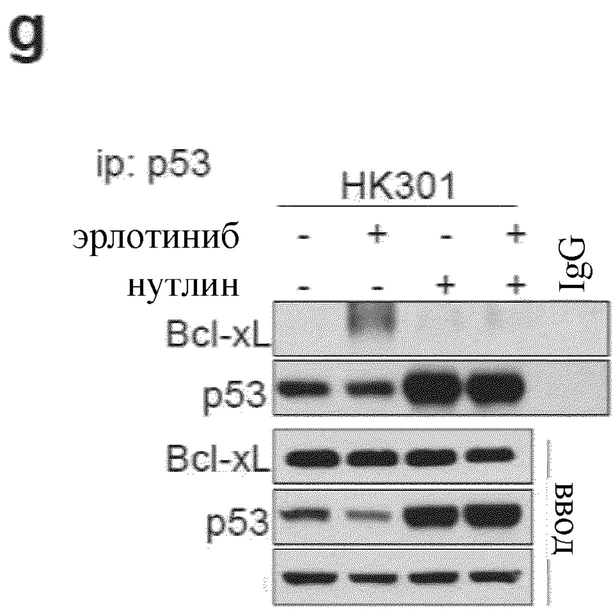
ФИГ. 24E



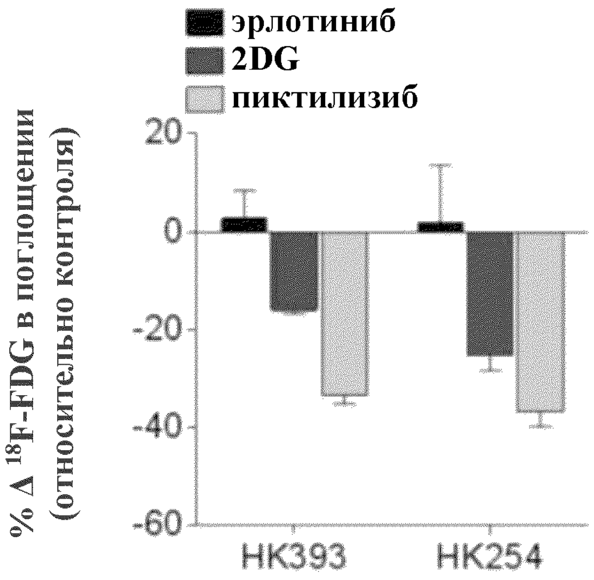
ФИГ. 24F



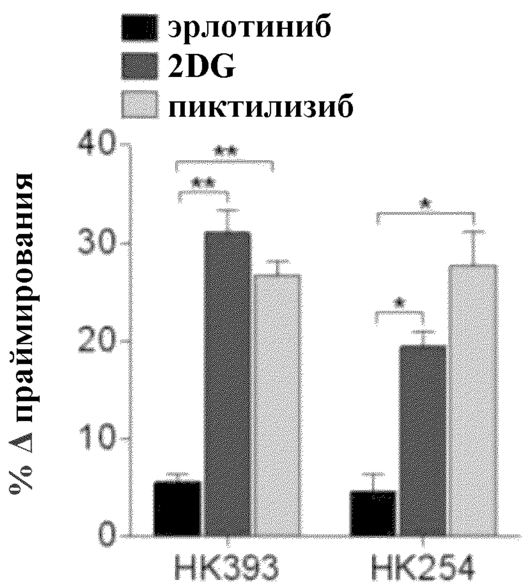
ФИГ. 24G



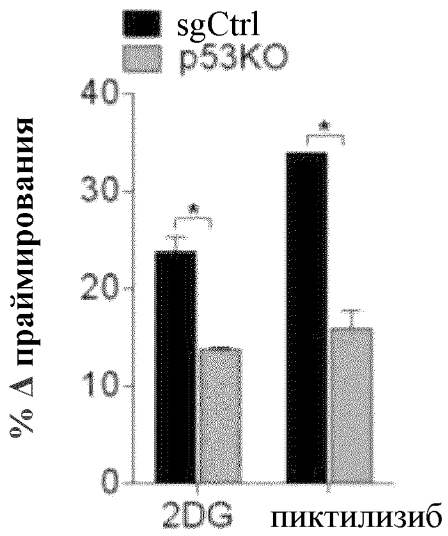
ФИГ. 25A



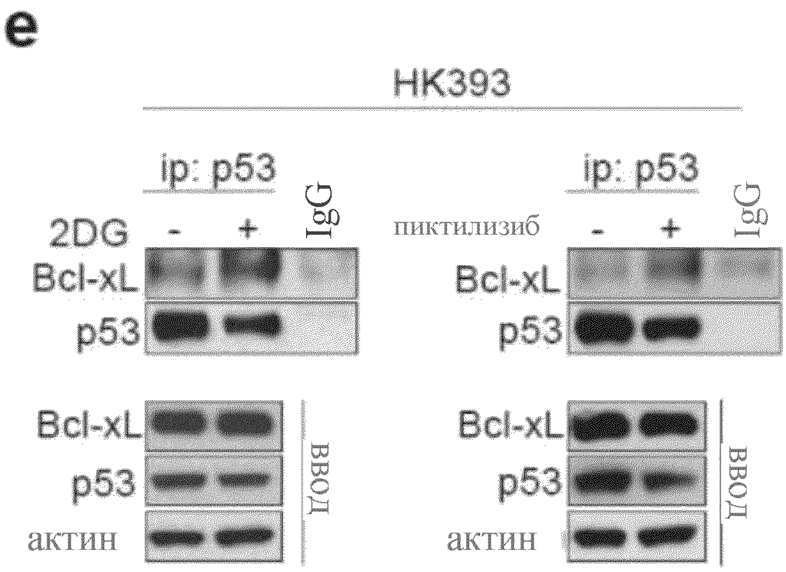
ФИГ. 25B



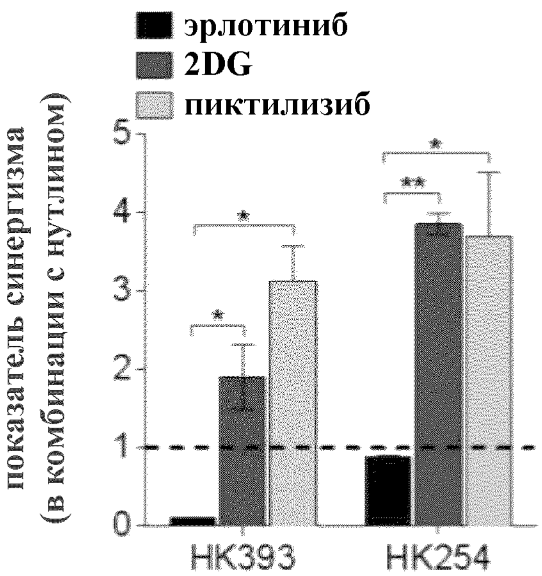
ФИГ. 25C



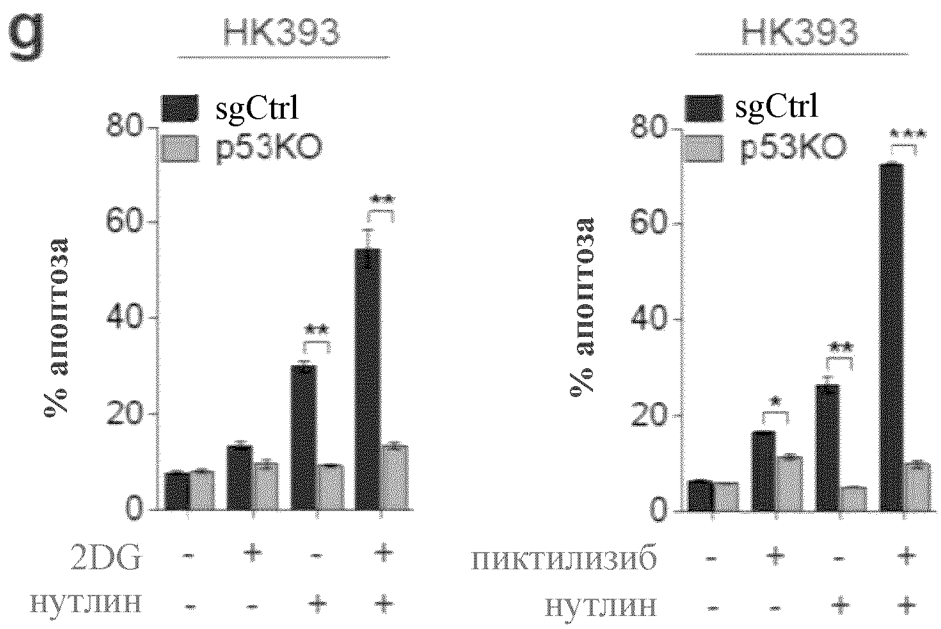
ФИГ. 25D



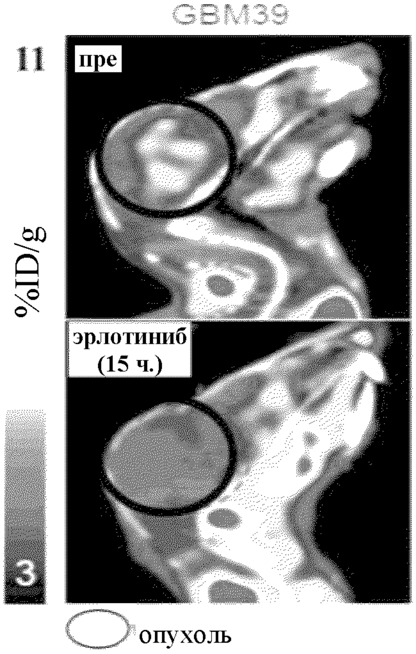
ФИГ. 25E



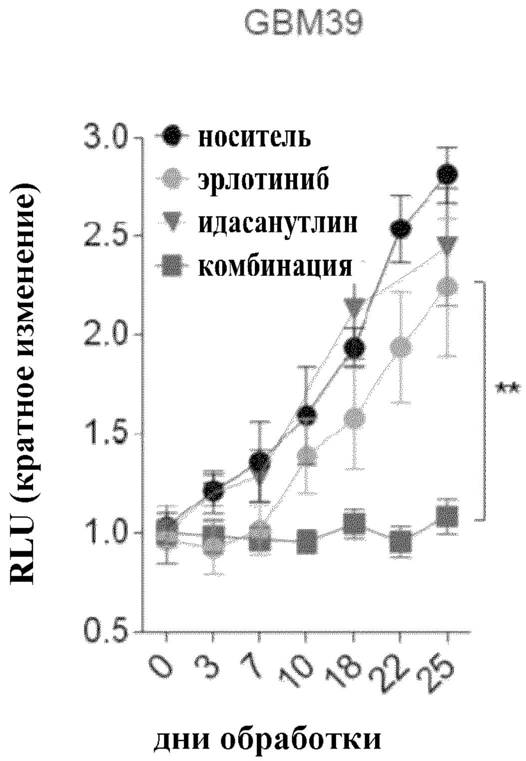
ФИГ. 25F



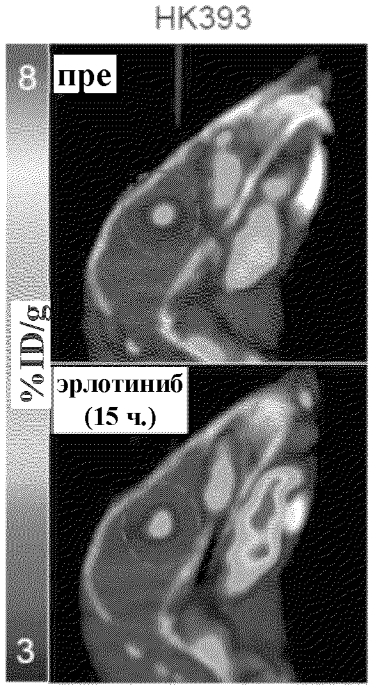
ФИГ. 26А



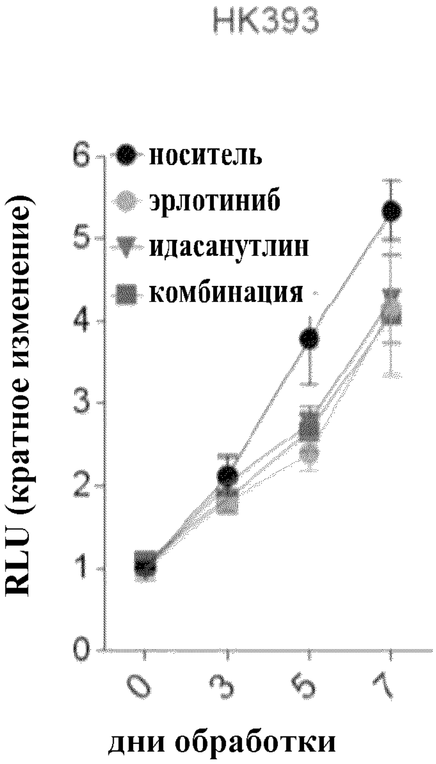
ФИГ. 26В



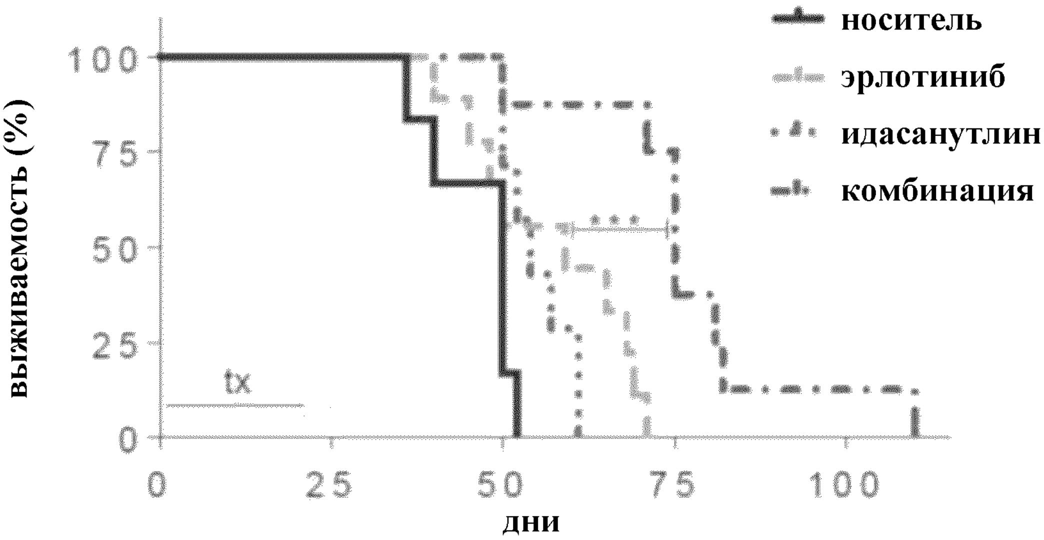
ФИГ. 26C



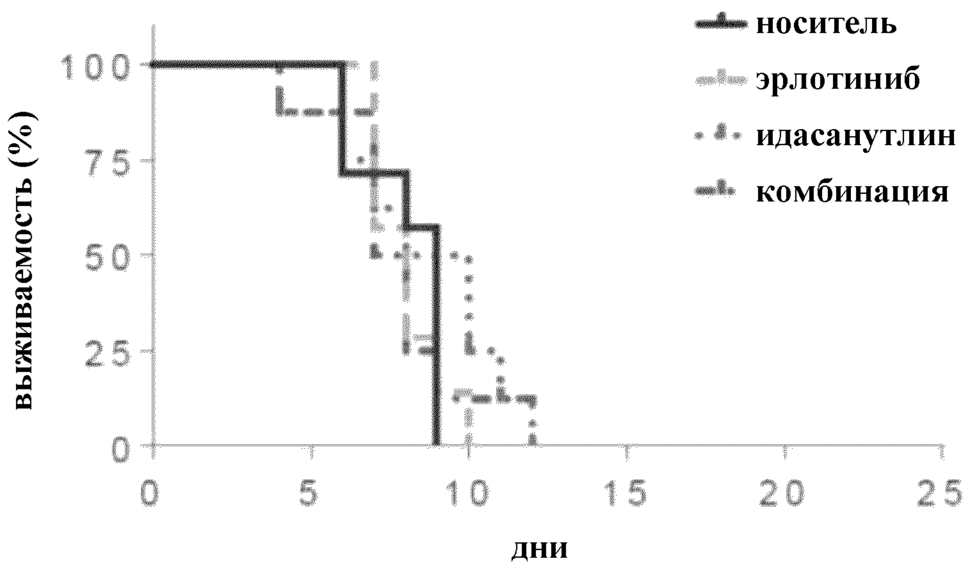
ФИГ. 26D



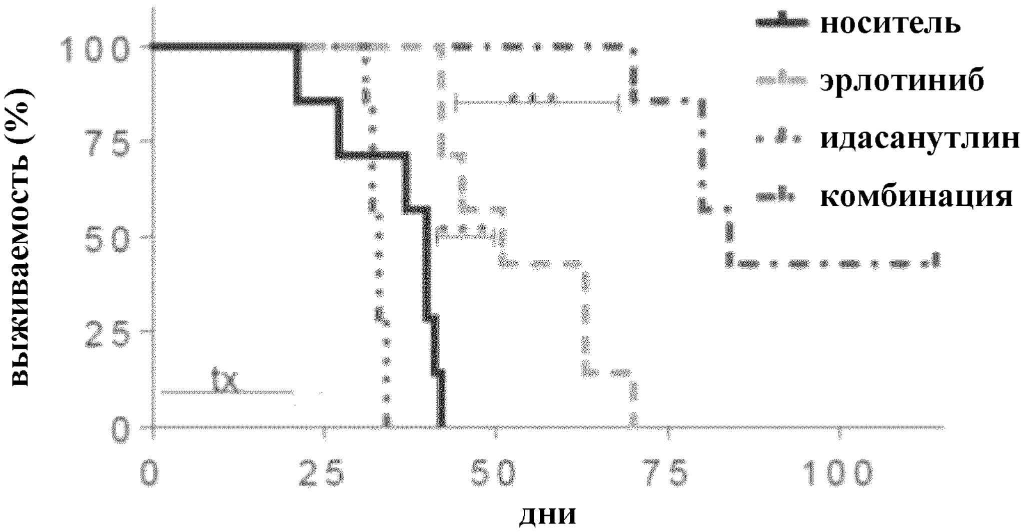
ФИГ. 26E



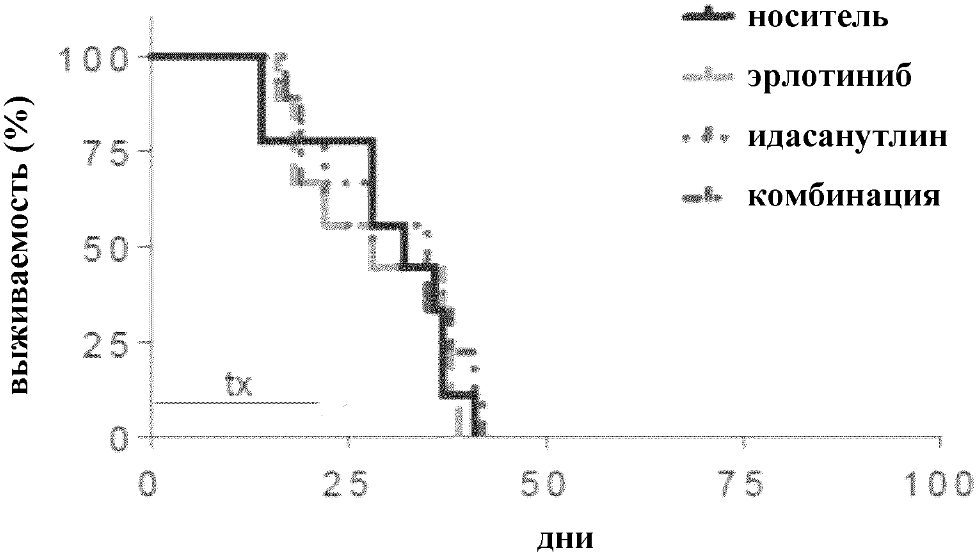
ФИГ. 26F



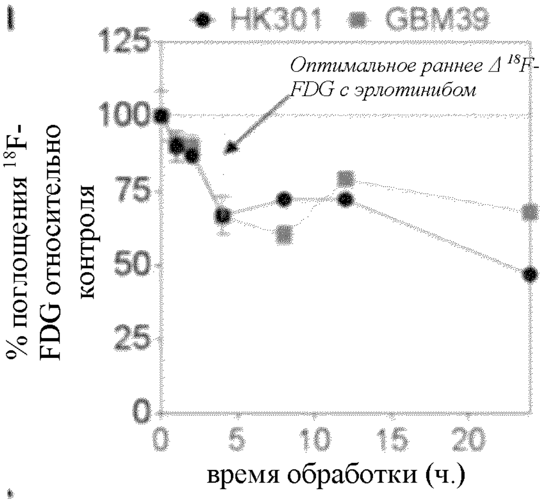
ФИГ. 26G



ФИГ. 26H

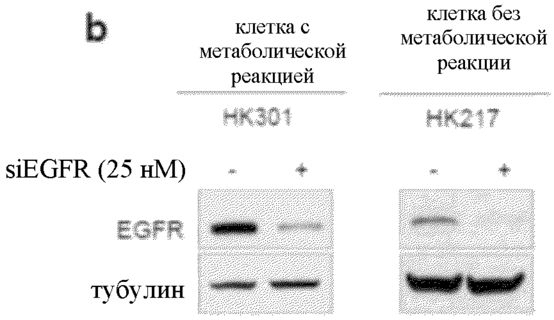


ФИГ. 27А

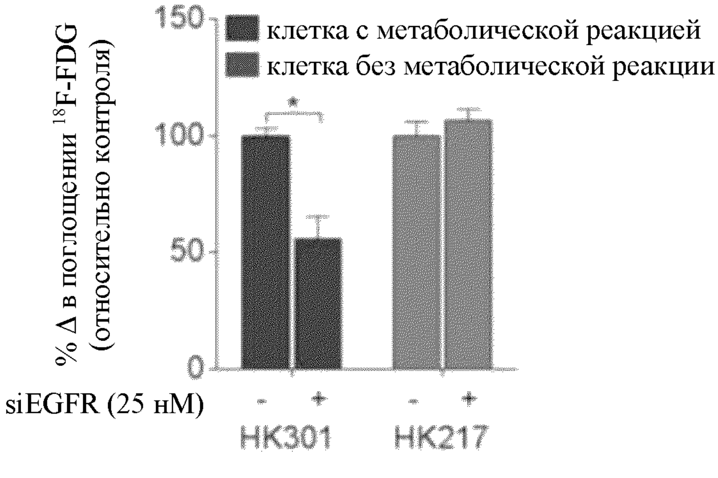


ФИГ. 27В

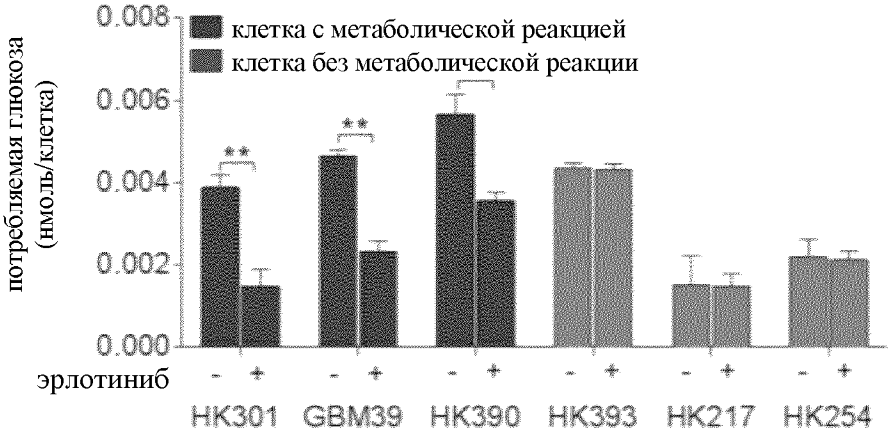
Фиг. 8



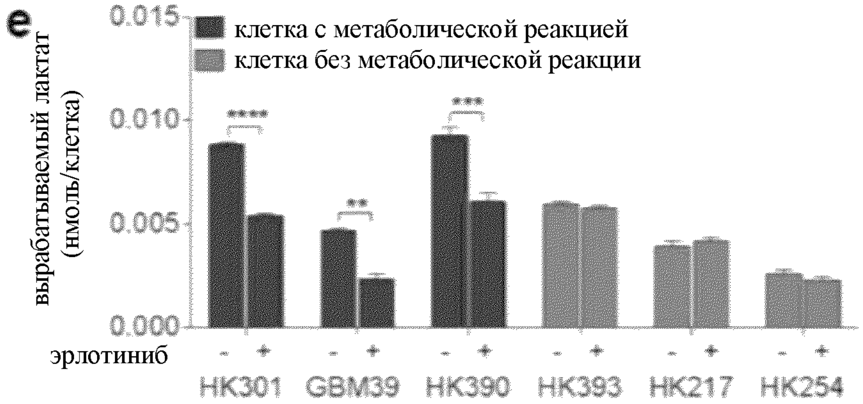
ФИГ. 27С



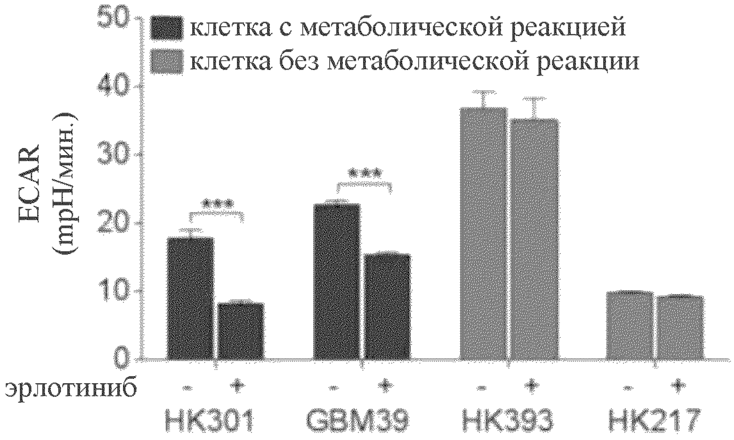
ФИГ. 27D



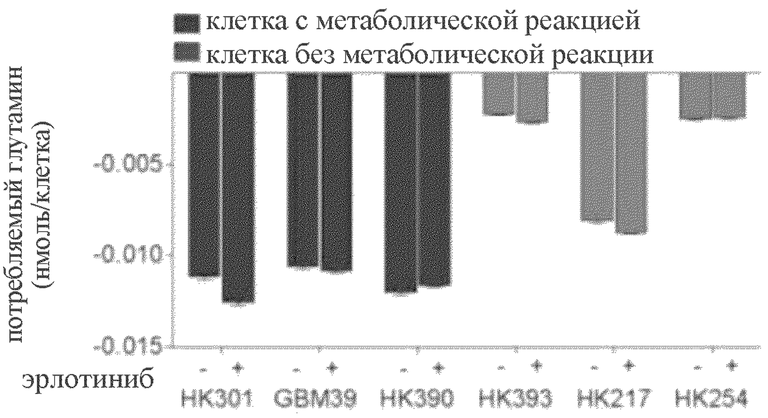
ФИГ. 27E



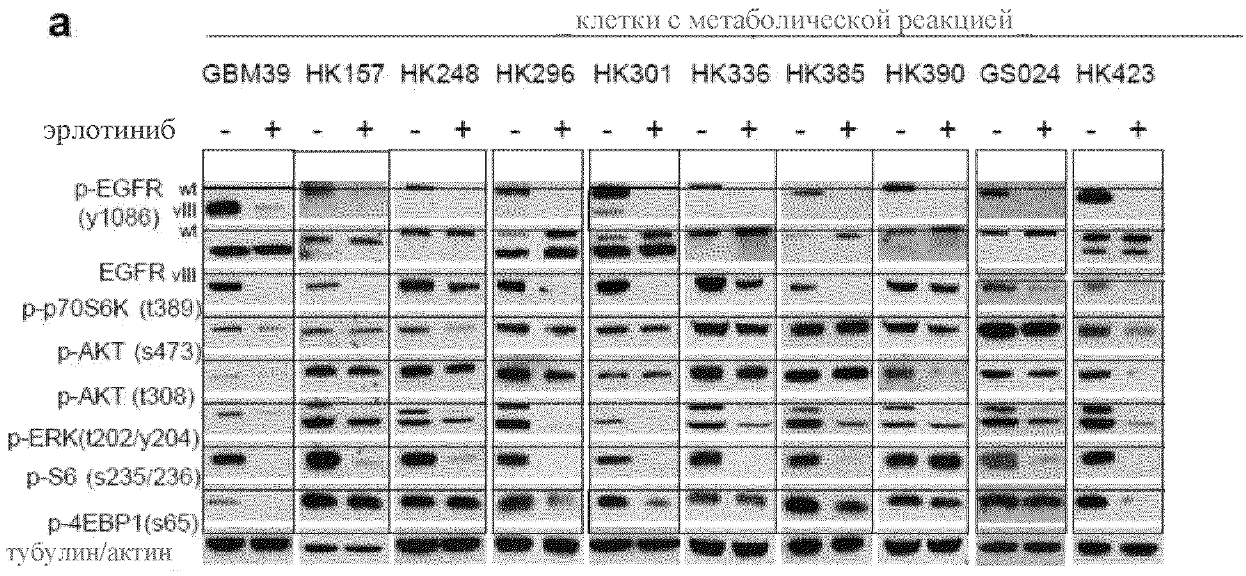
ФИГ. 27F



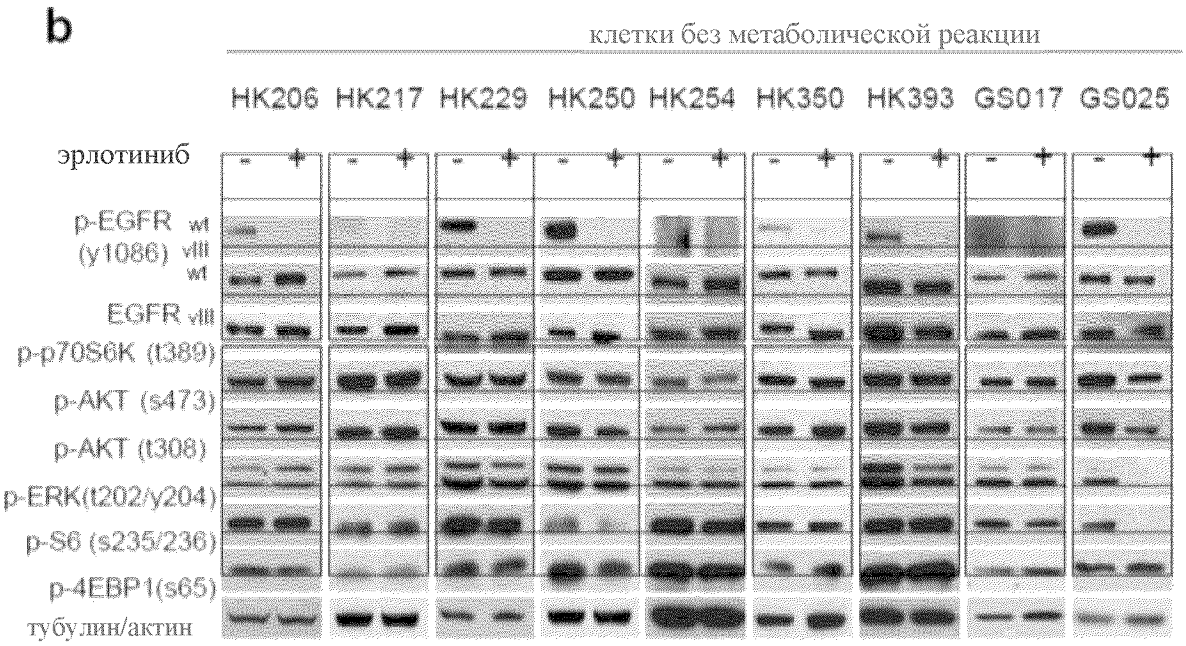
ФИГ. 27G



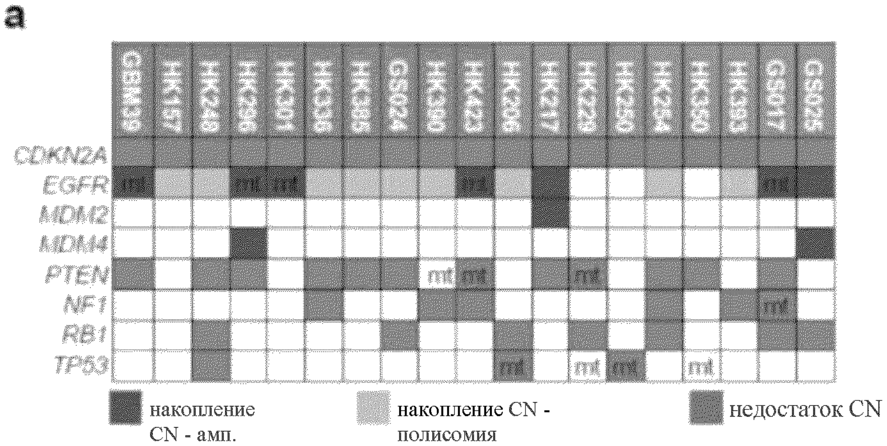
ФИГ. 28A



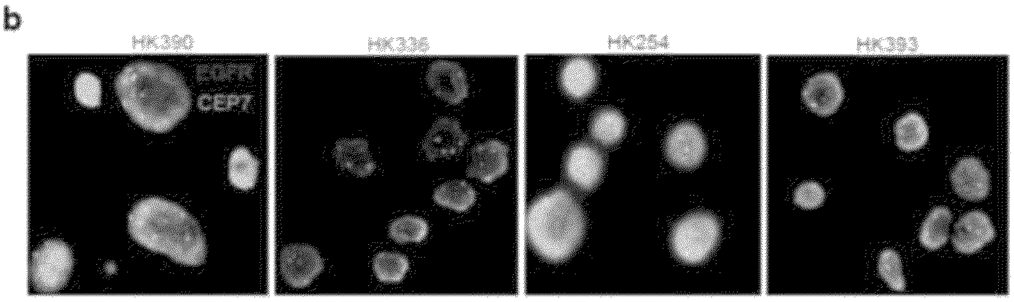
ФИГ. 28B



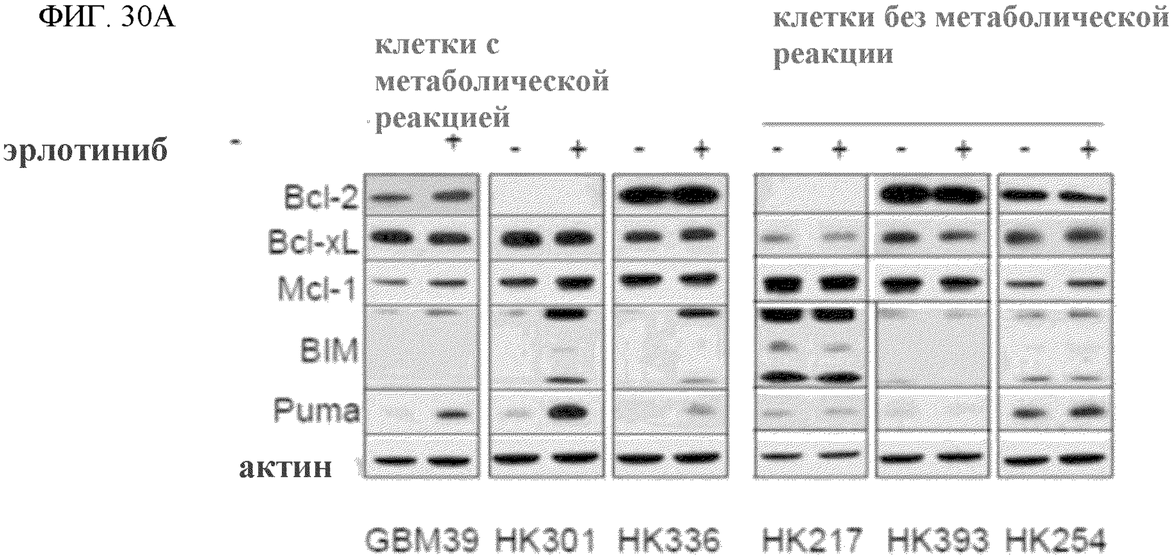
ФИГ. 29А



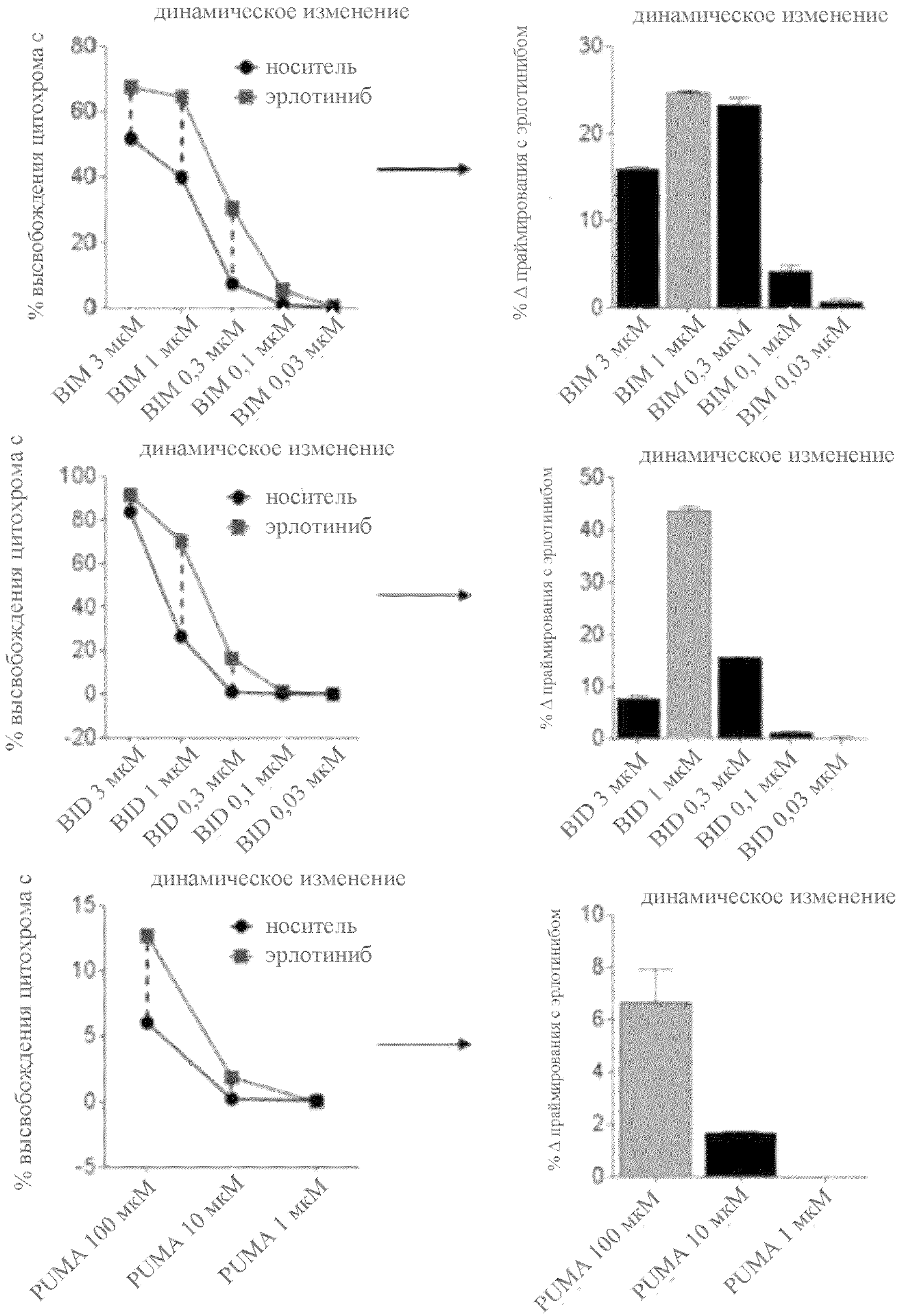
ФИГ. 29В



ФИГ. 30А

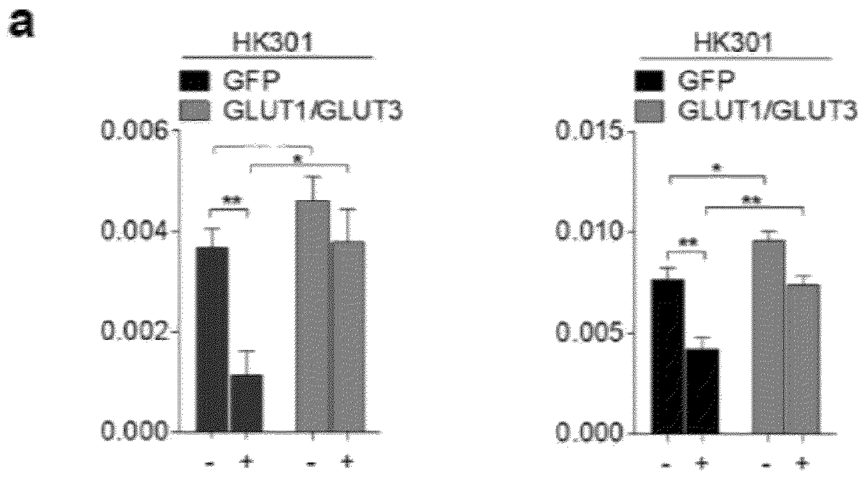


ФИГ. 30B

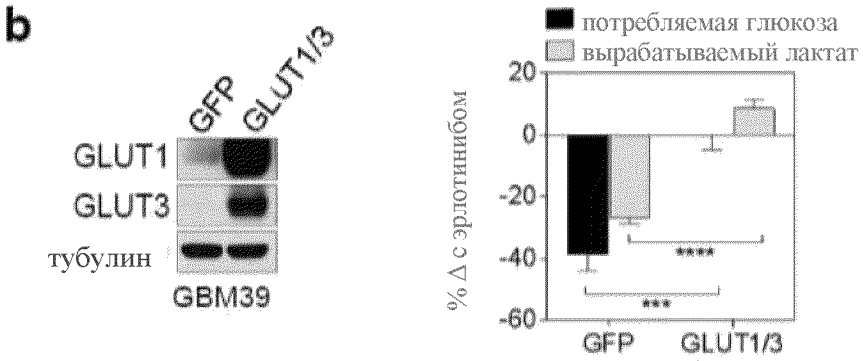


динамическое изменение
% высвобождения цитохрома с
80
60
40
20
0
носитель
эрлотиниб
BIM 3 мкМ
BIM 1 мкМ
BIM 0,3 мкМ
BIM 0,1 мкМ
BIM 0,03 мкМ
динамическое изменение
% Δ праймирования с эрлотинибом
30
20
10
0
BIM 3 мкМ
BIM 1 мкМ
BIM 0,3 мкМ
BIM 0,1 мкМ
BIM 0,03 мкМ
динамическое изменение
% высвобождения цитохрома с
100
80
60
40
20
0
-20
носитель
эрлотиниб
BID 3 мкМ
BID 1 мкМ
BID 0,3 мкМ
BID 0,1 мкМ
BID 0,03 мкМ
динамическое изменение
% Δ праймирования с эрлотинибом
50
40
30
20
10
0
BID 3 мкМ
BID 1 мкМ
BID 0,3 мкМ
BID 0,1 мкМ
BID 0,03 мкМ
динамическое изменение
% высвобождения цитохрома с
15
10
5
0
-5
носитель
эрлотиниб
PUMA 100 мкМ
PUMA 10 мкМ
PUMA 1 мкМ
динамическое изменение
% Δ праймирования с эрлотинибом
10
8
6
4
2
0
PUMA 100 мкМ
PUMA 10 мкМ
PUMA 1 мкМ

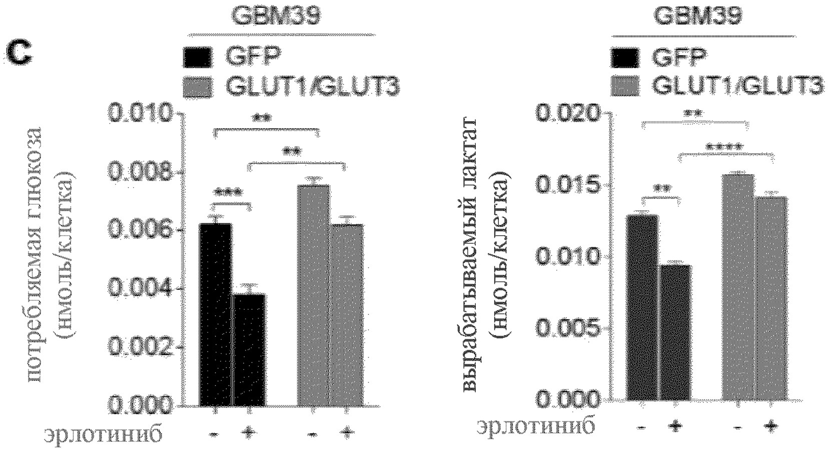
ФИГ. 31A.



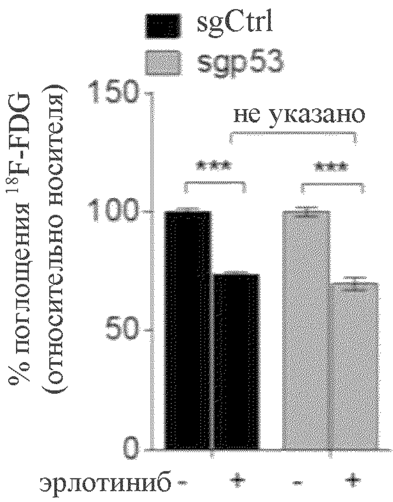
ФИГ. 31B.



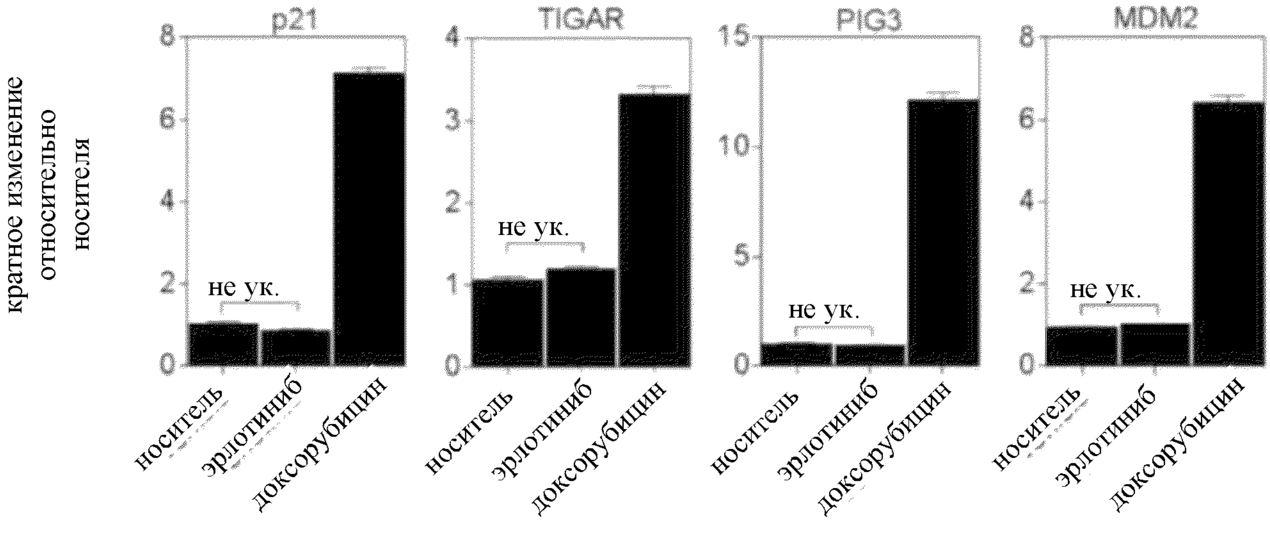
ФИГ. 31C



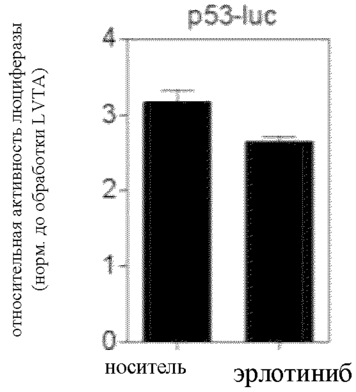
ФИГ. 32A



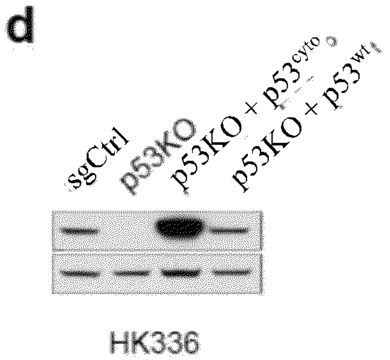
ФИГ. 32B



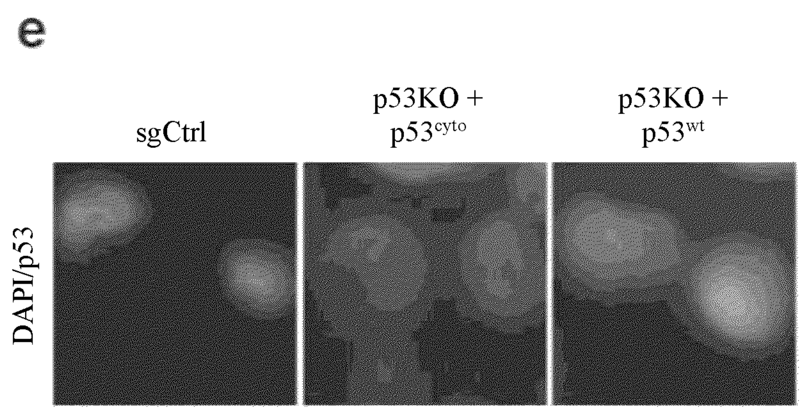
ФИГ. 32C



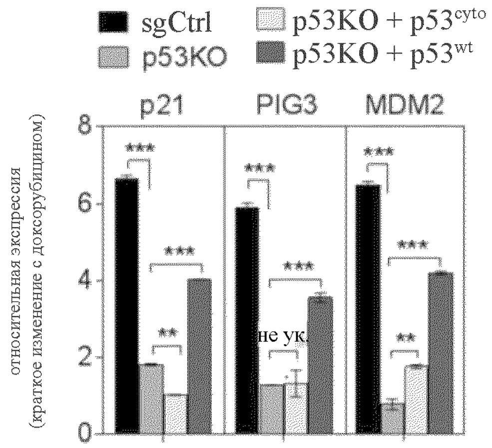
ФИГ. 32D



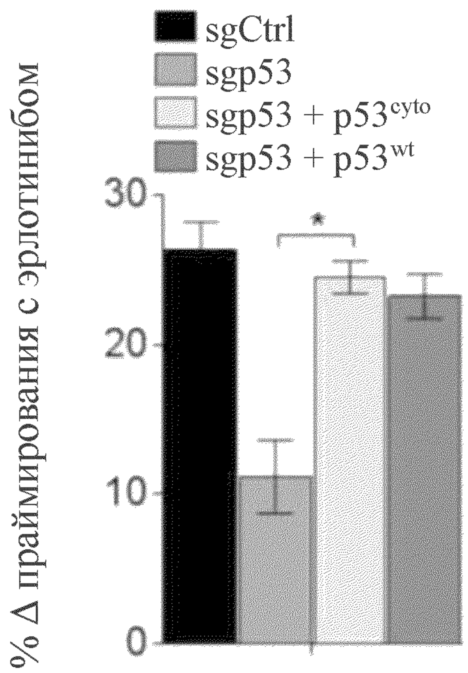
ФИГ. 32E



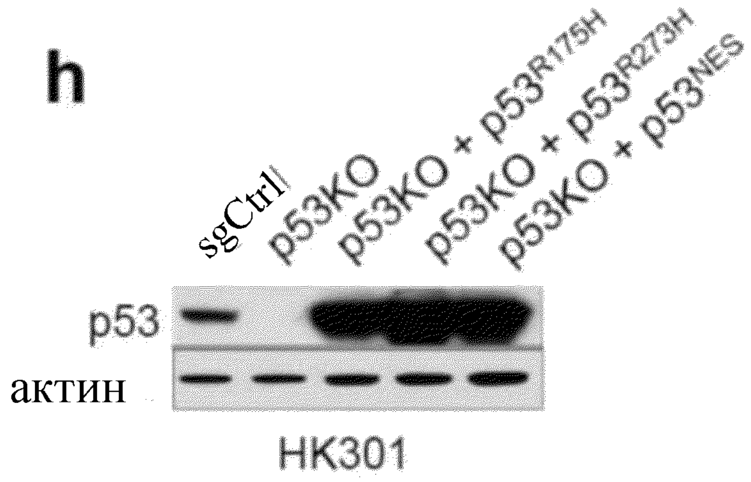
ФИГ. 32F



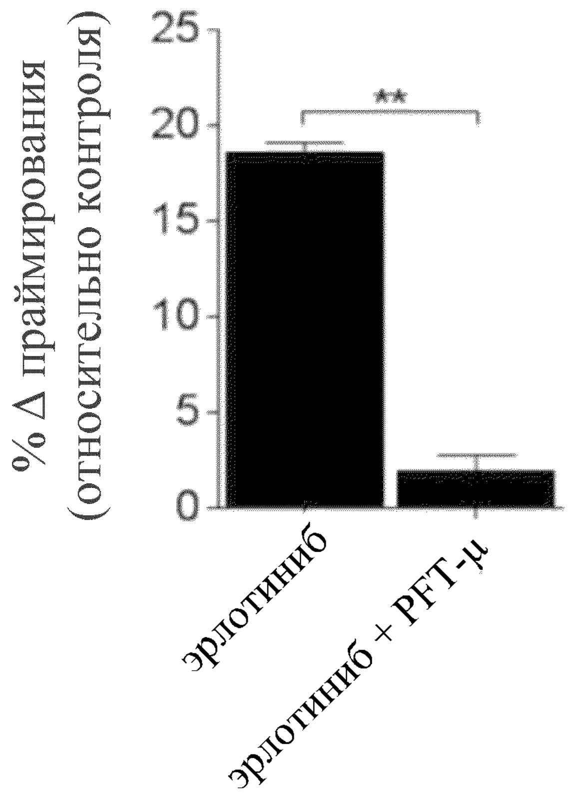
ФИГ. 32G



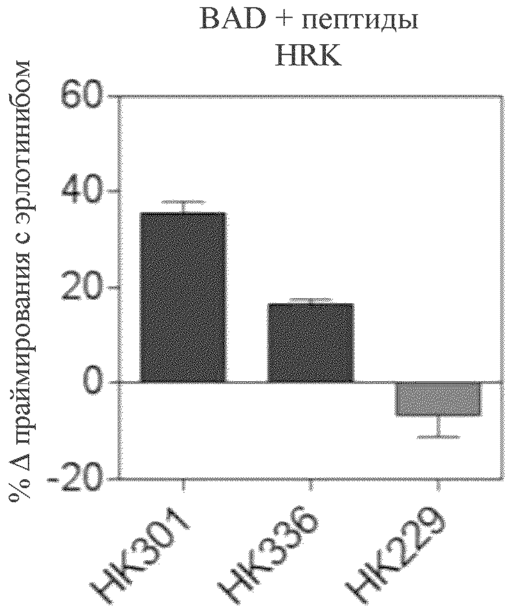
ФИГ. 32H



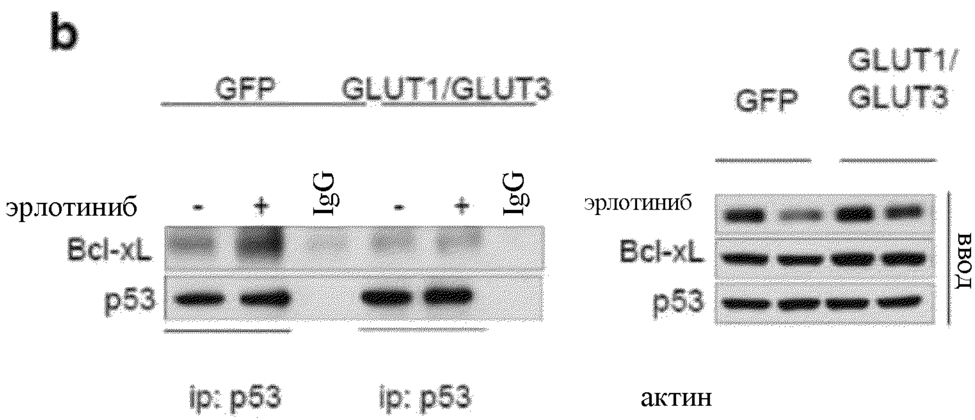
ФИГ. 32I



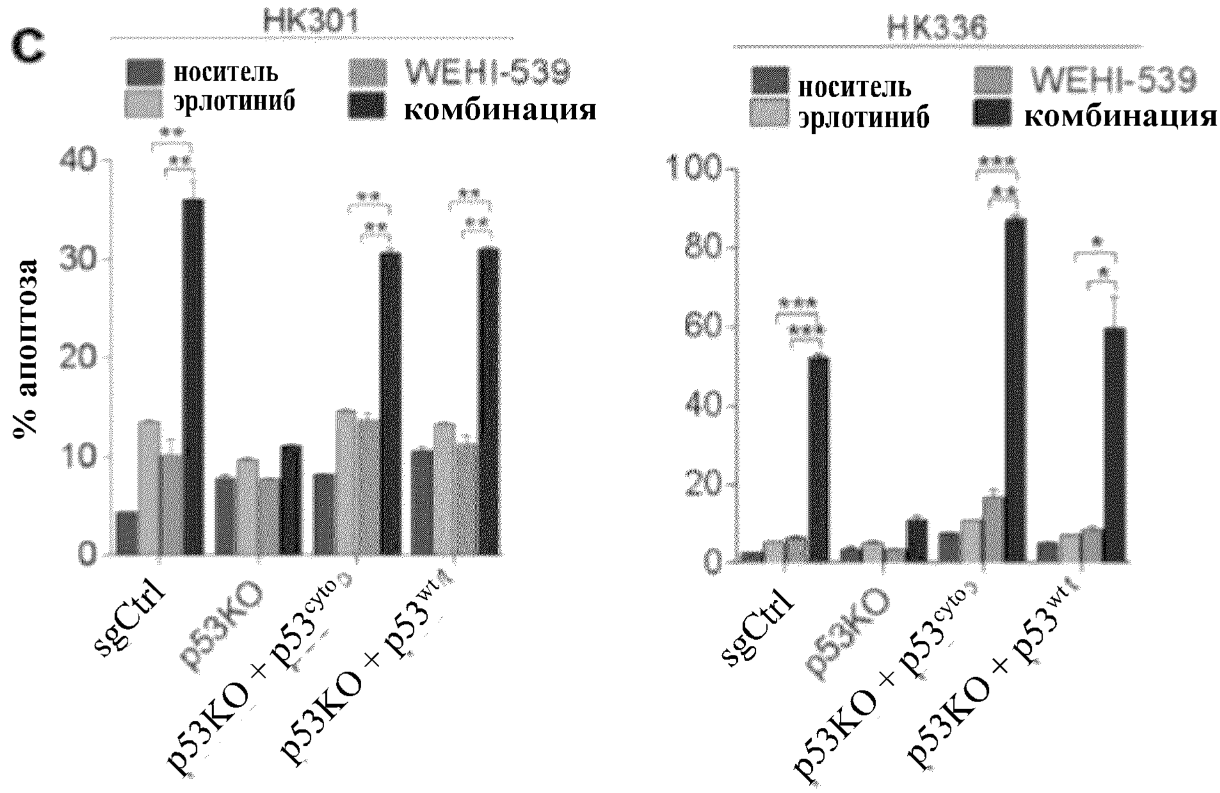
ФИГ. 33A



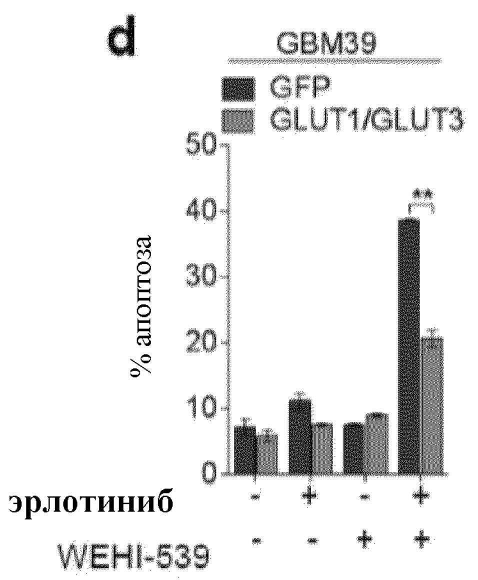
ФИГ. 33B



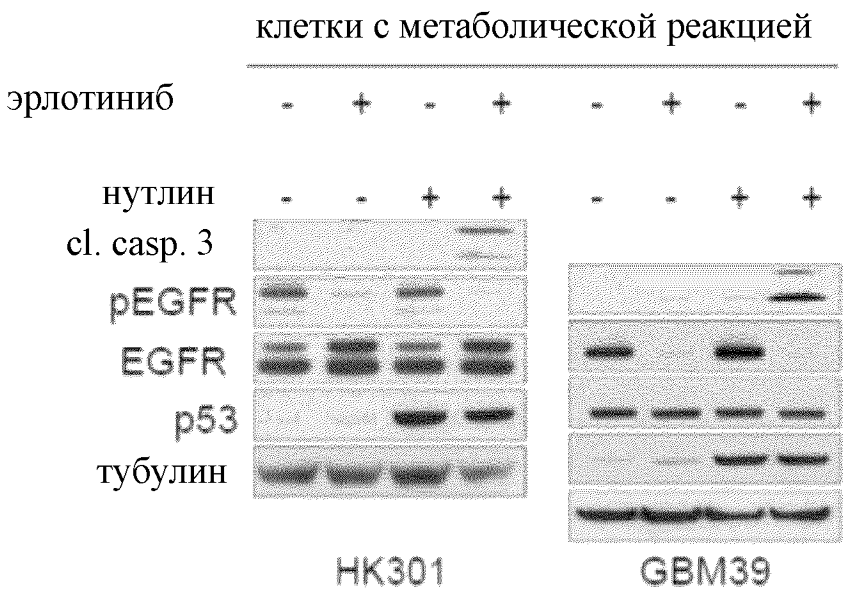
ФИГ. 33C



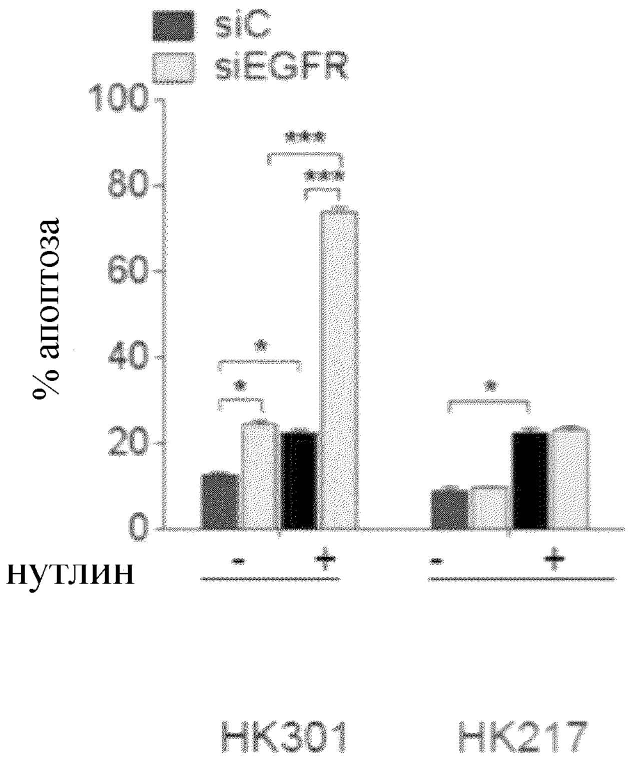
ФИГ. 33D



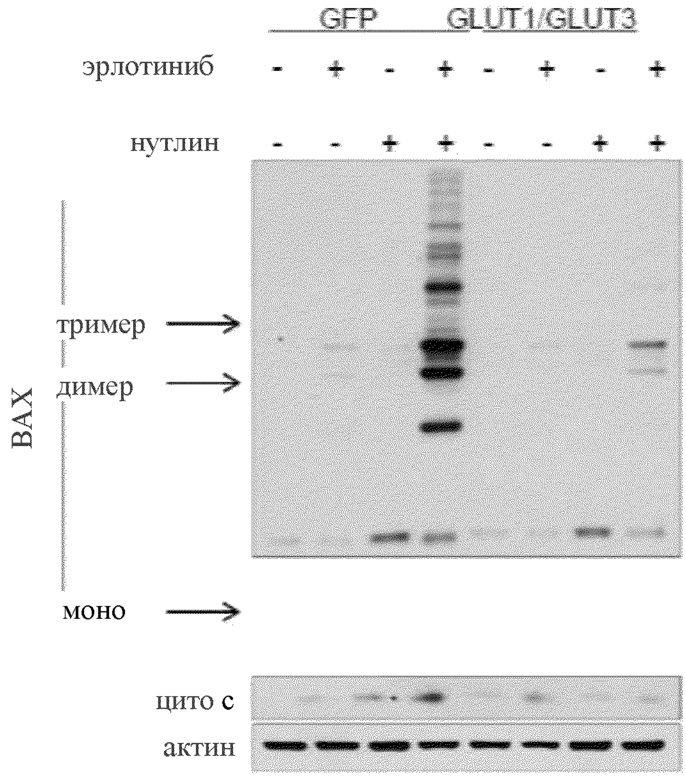
ФИГ. 34A



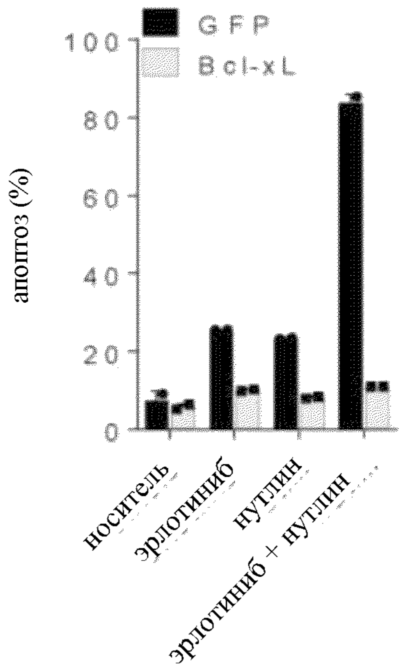
ФИГ. 34B



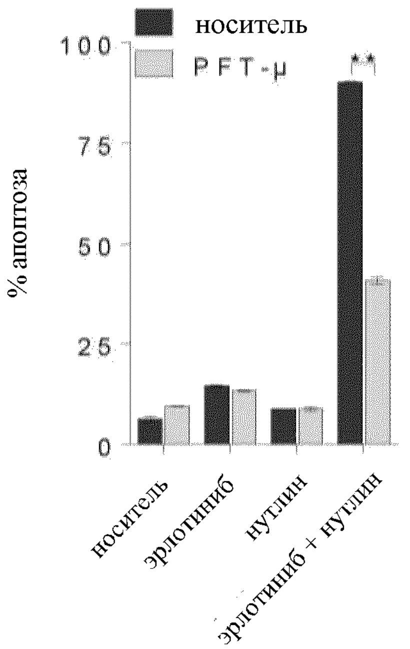
ФИГ. 34C



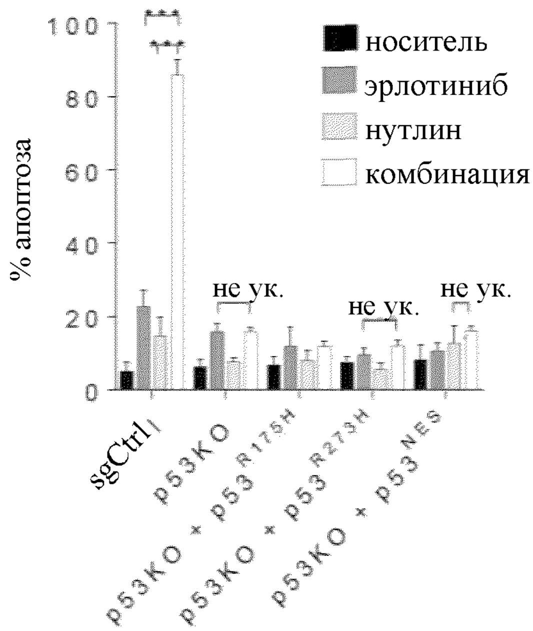
ФИГ. 34D



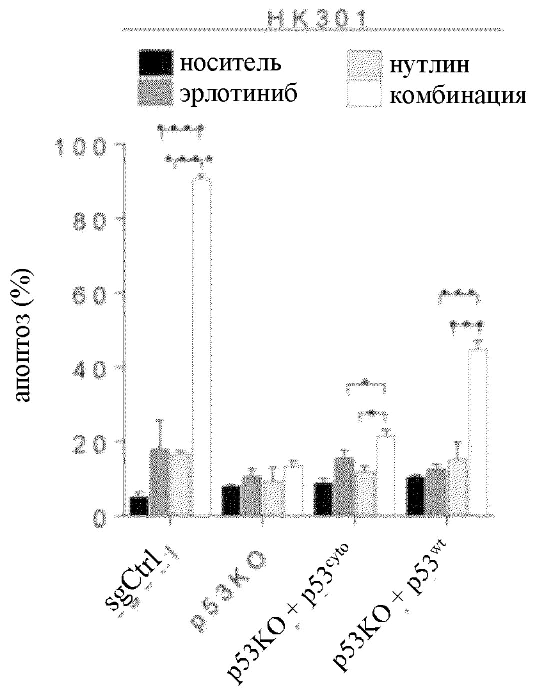
ФИГ. 34E



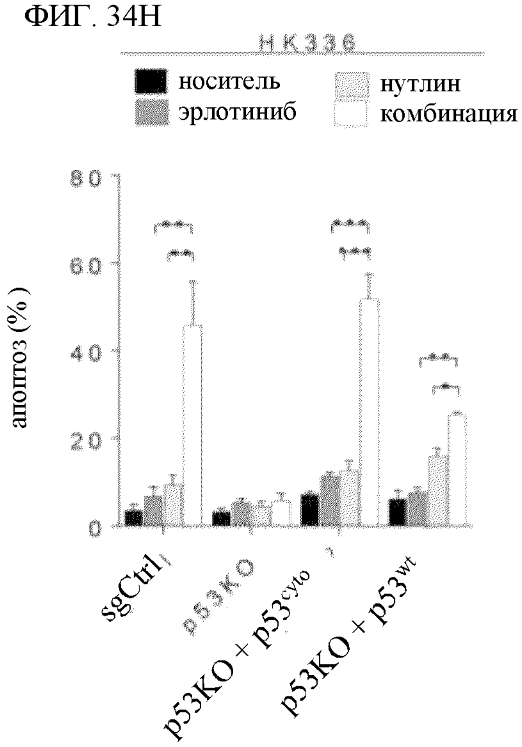
ФИГ. 34F



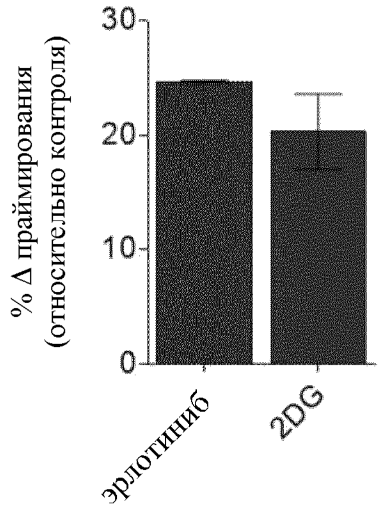
ФИГ. 34G



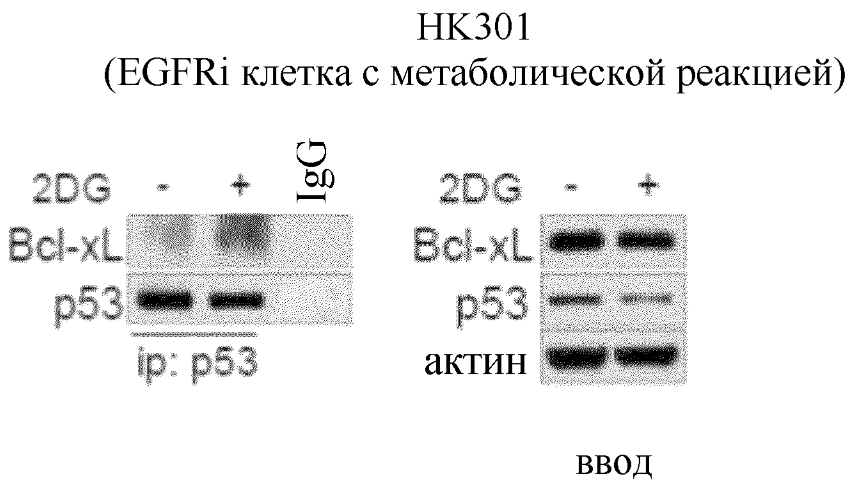
ФИГ. 34H



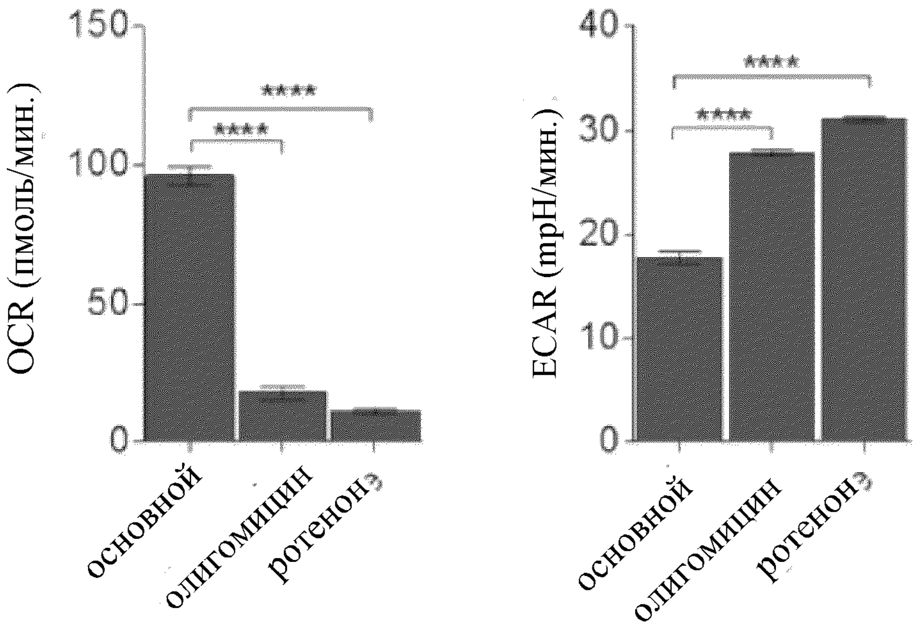
ФИГ. 35А



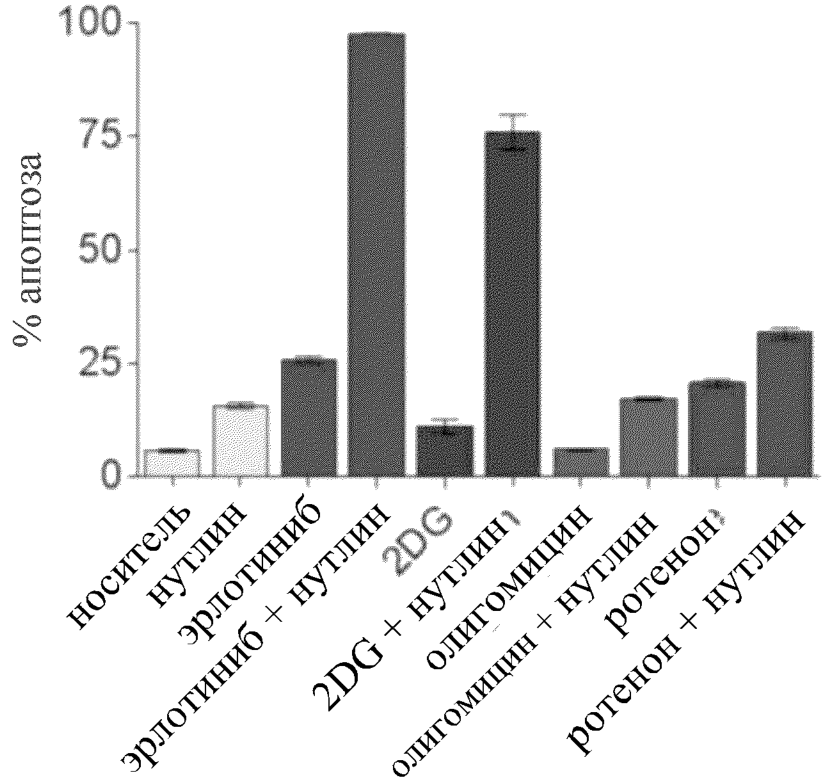
ФИГ. 35В



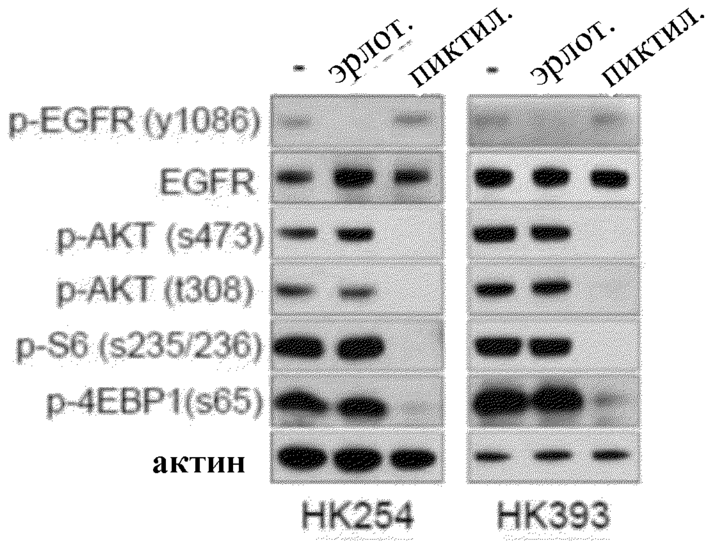
ФИГ. 35C



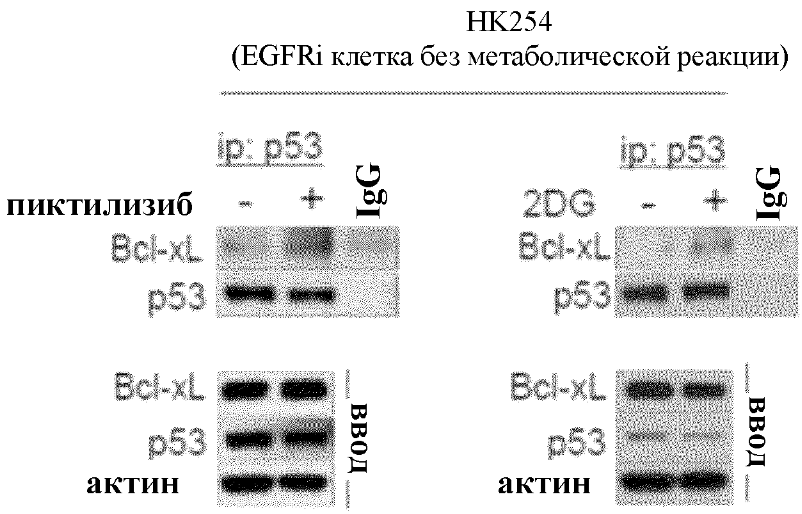
ФИГ. 35D



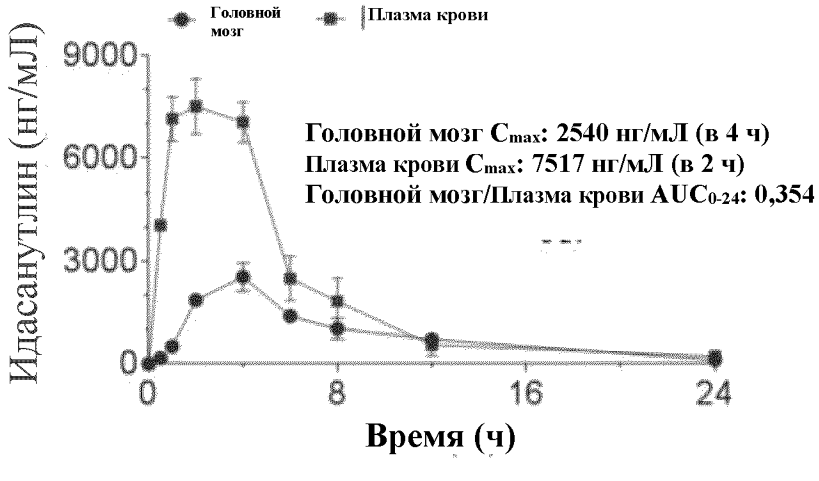
ФИГ. 35E



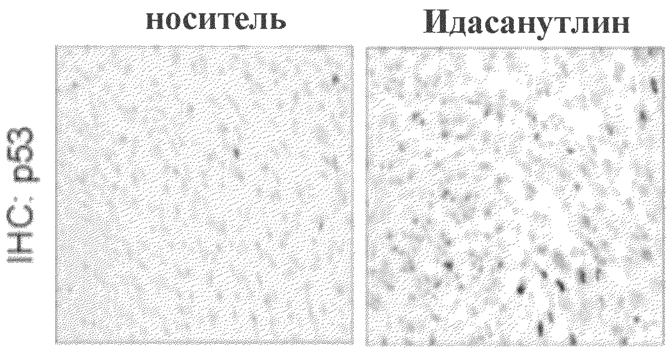
ФИГ. 35F.



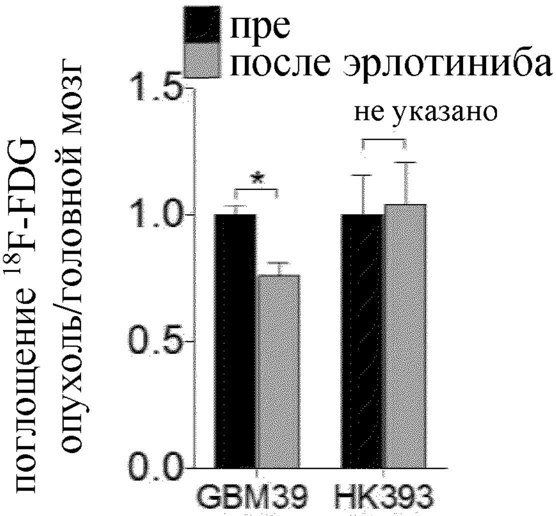
ФИГ. 36A



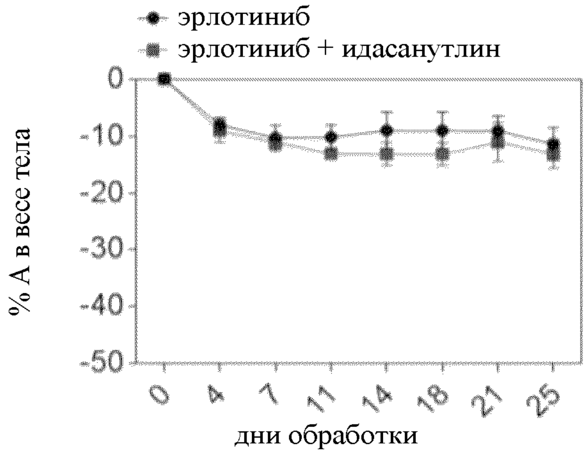
ФИГ. 36B



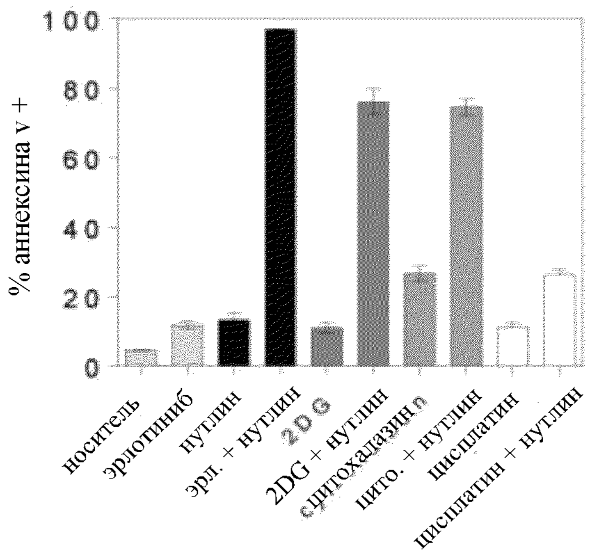
ФИГ. 36C



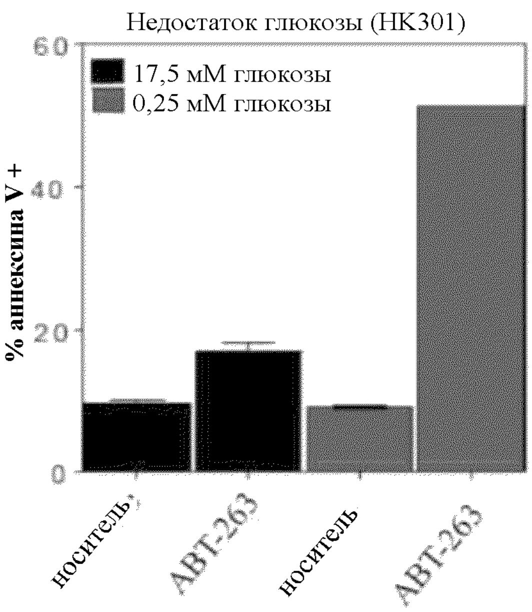
ФИГ. 36D



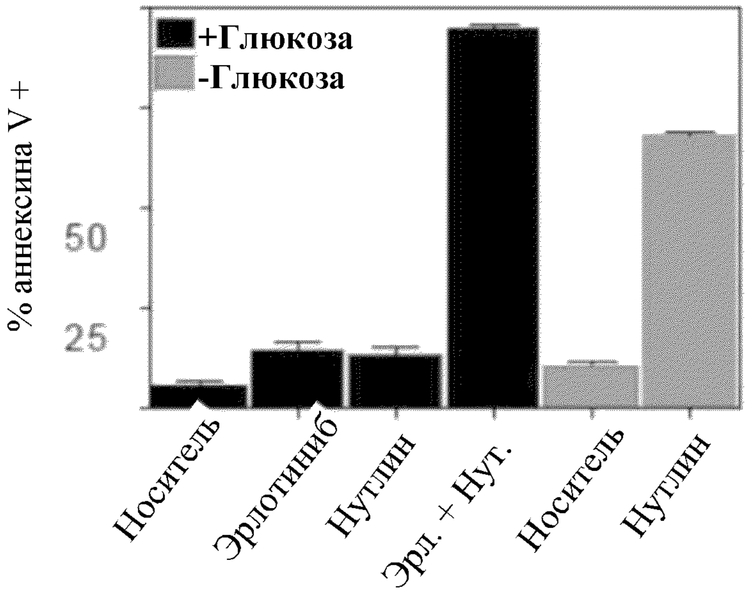
ФИГ. 37A



ФИГ. 37B

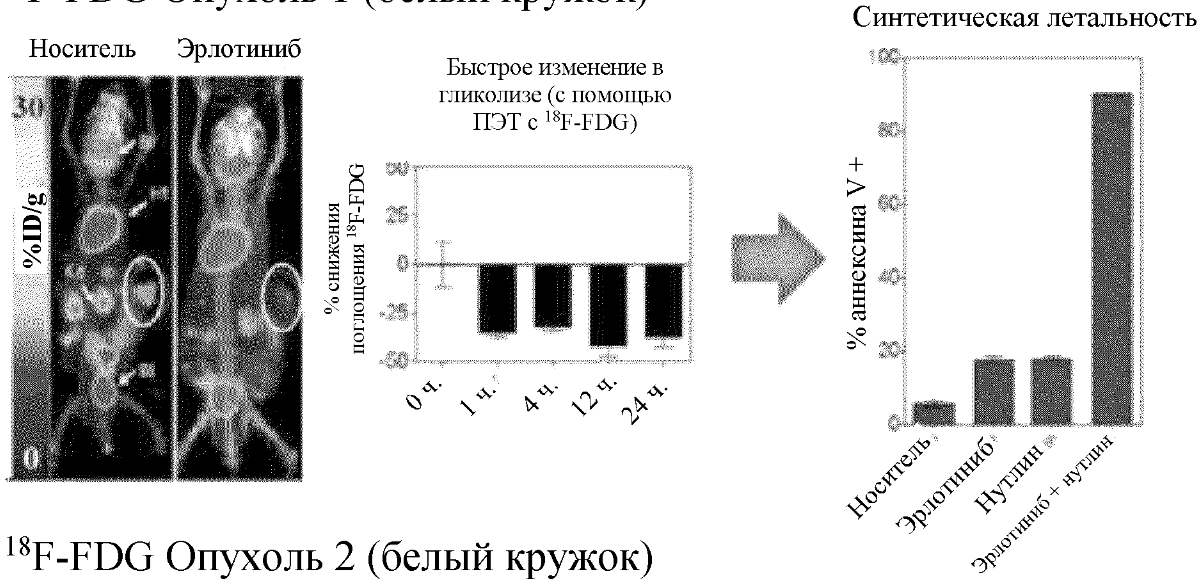


ФИГ. 37С

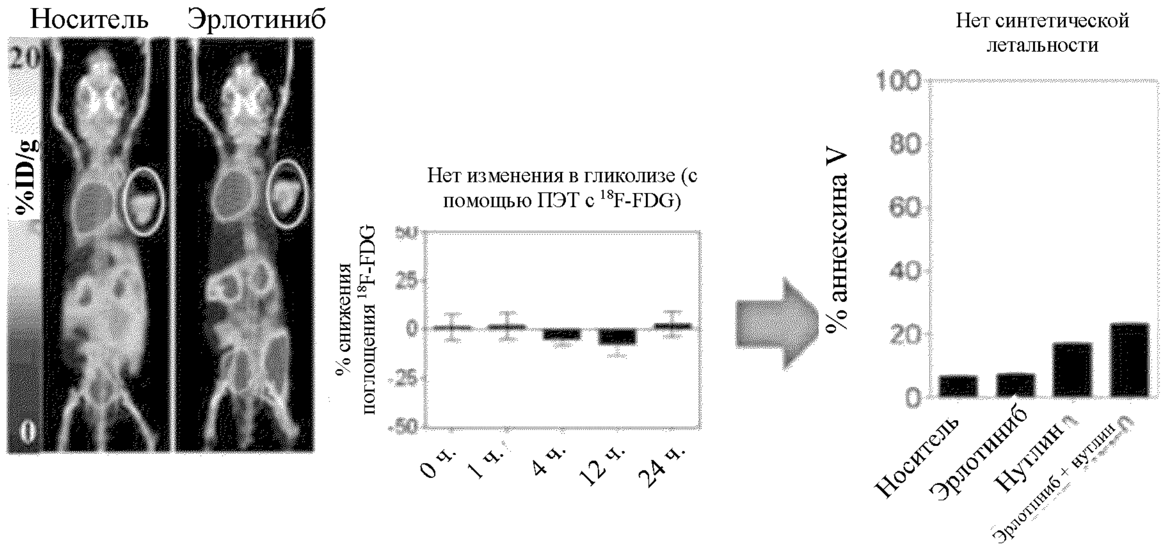

+Глюкоза
-Глюкоза
% аннексина V +
50
25
Носитель
Эрлотиниб
Нутлин
Эрл. + Нут.
Носитель
Нутлин

ФИГ. 38

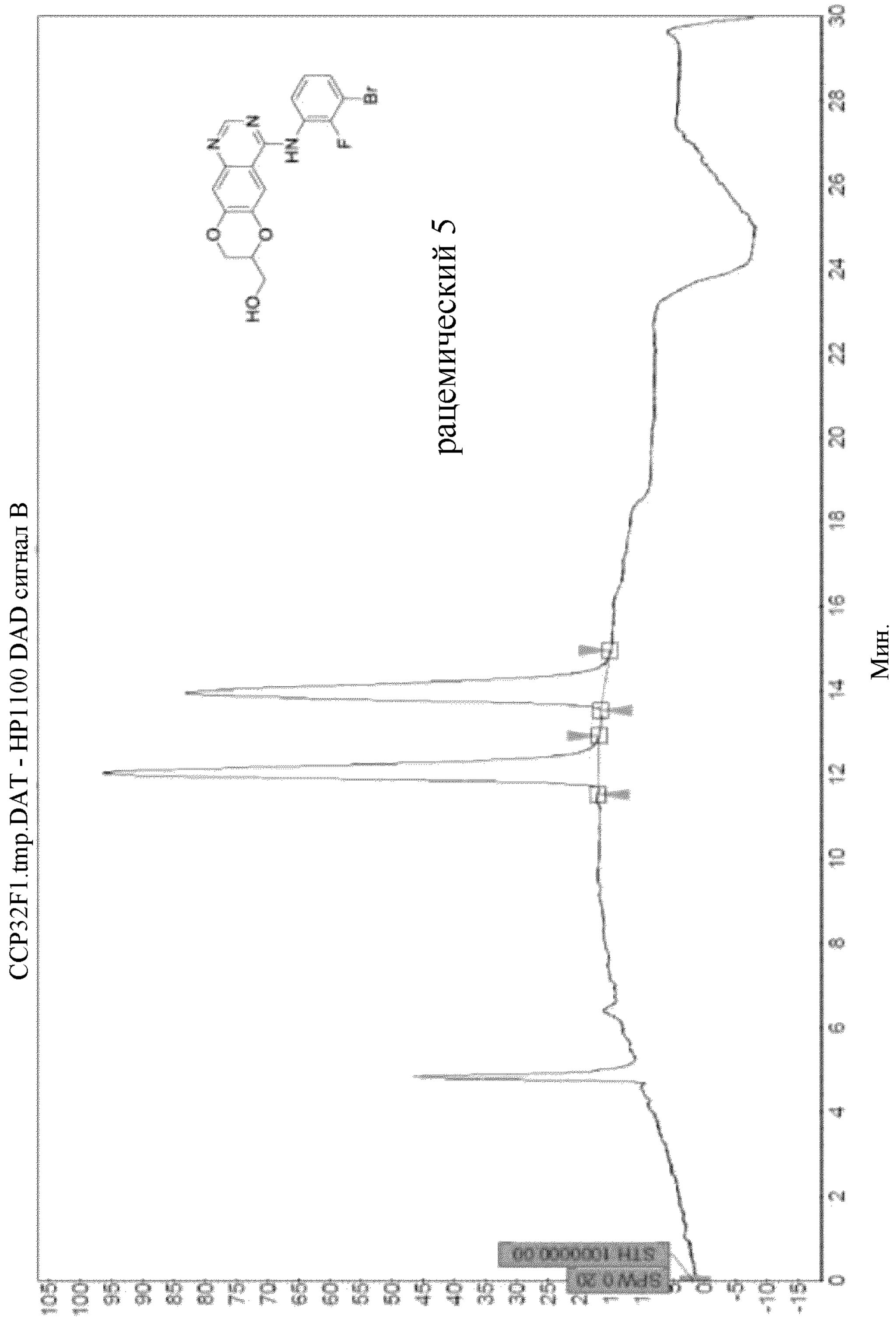
ПЭТ с ^{18}F-FDG Опухоль 1 (белый кружок)



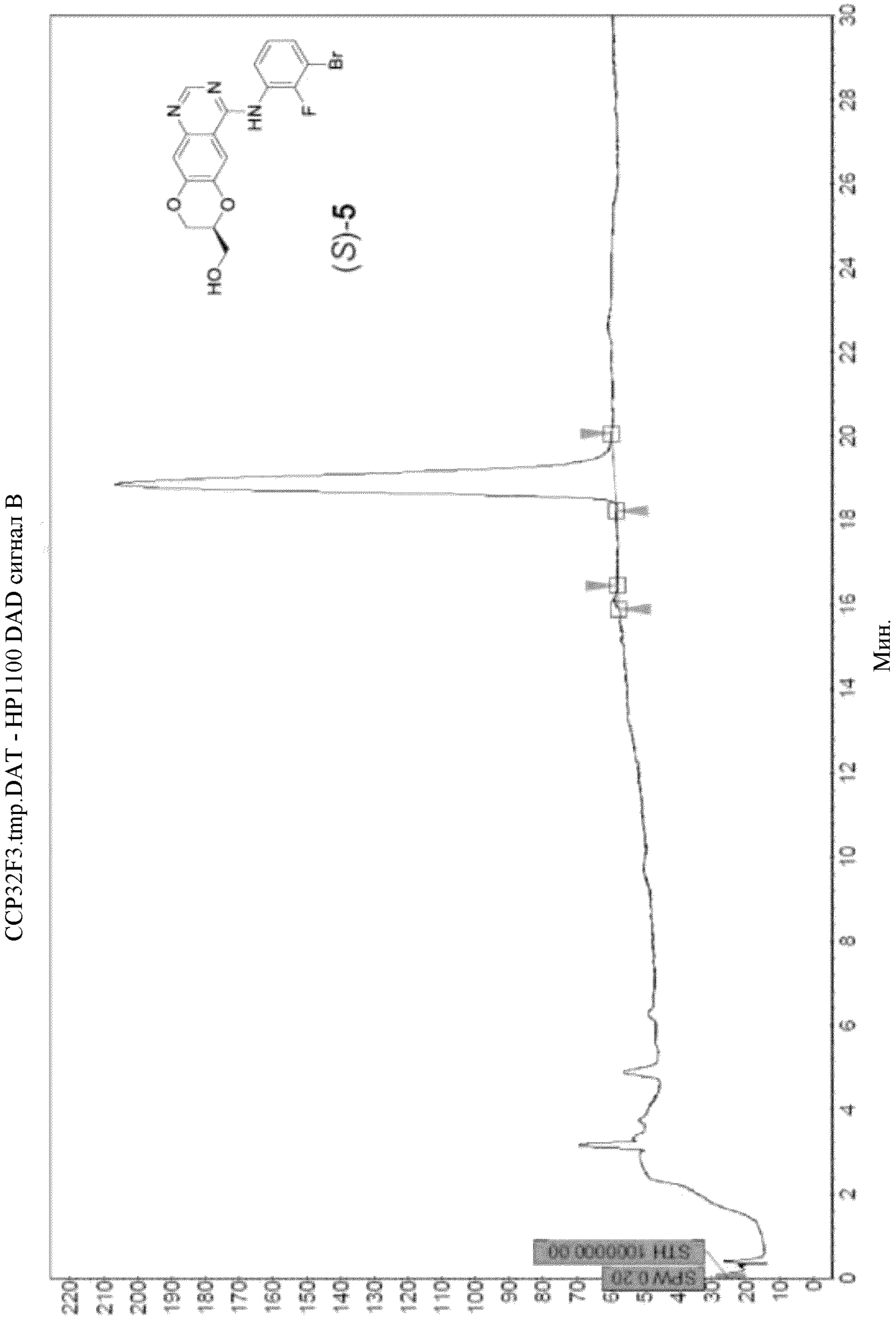
ПЭТ с ^{18}F-FDG Опухоль 2 (белый кружок)



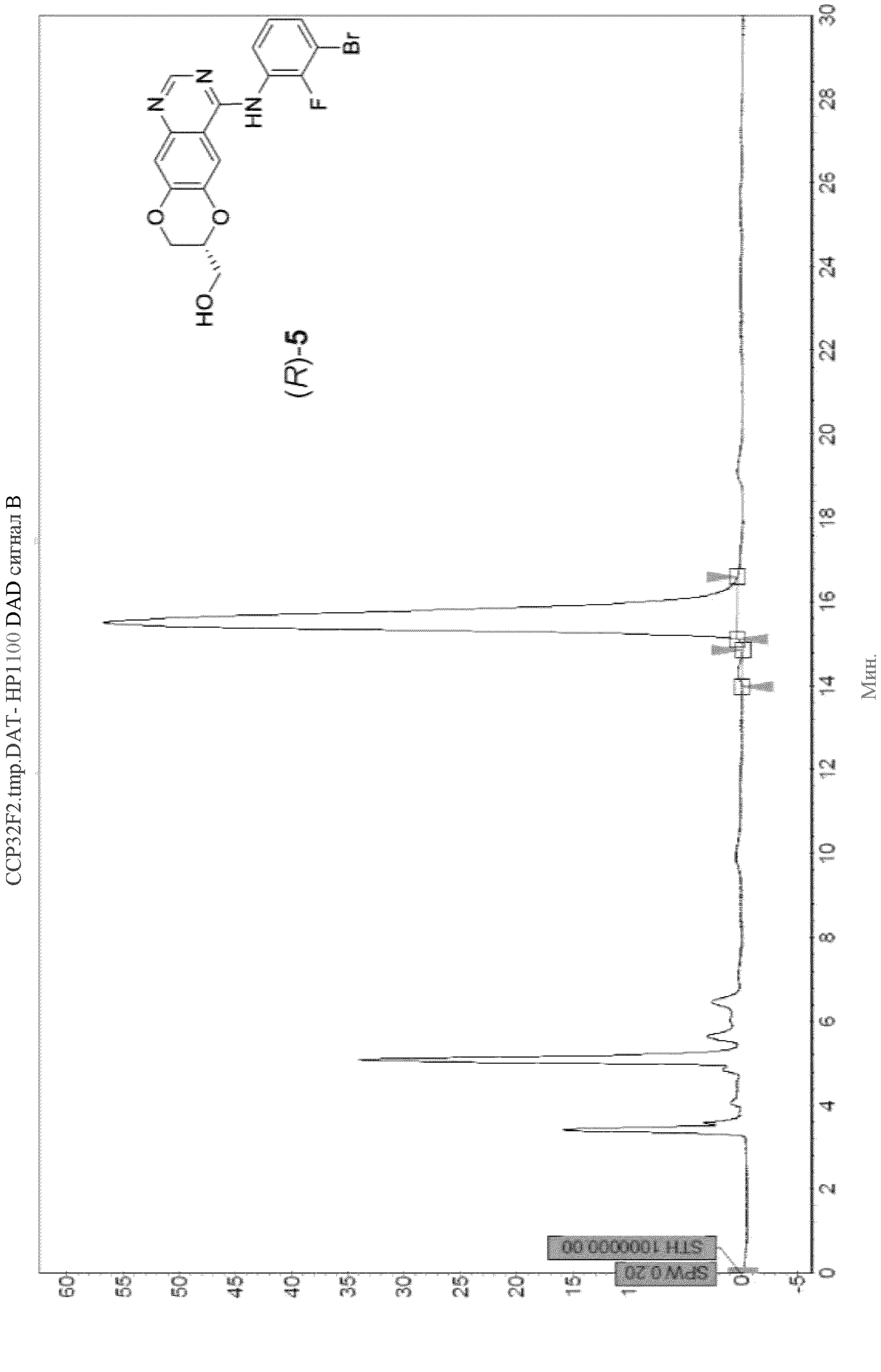
ФИГ. 39A



ФИГ. 39B

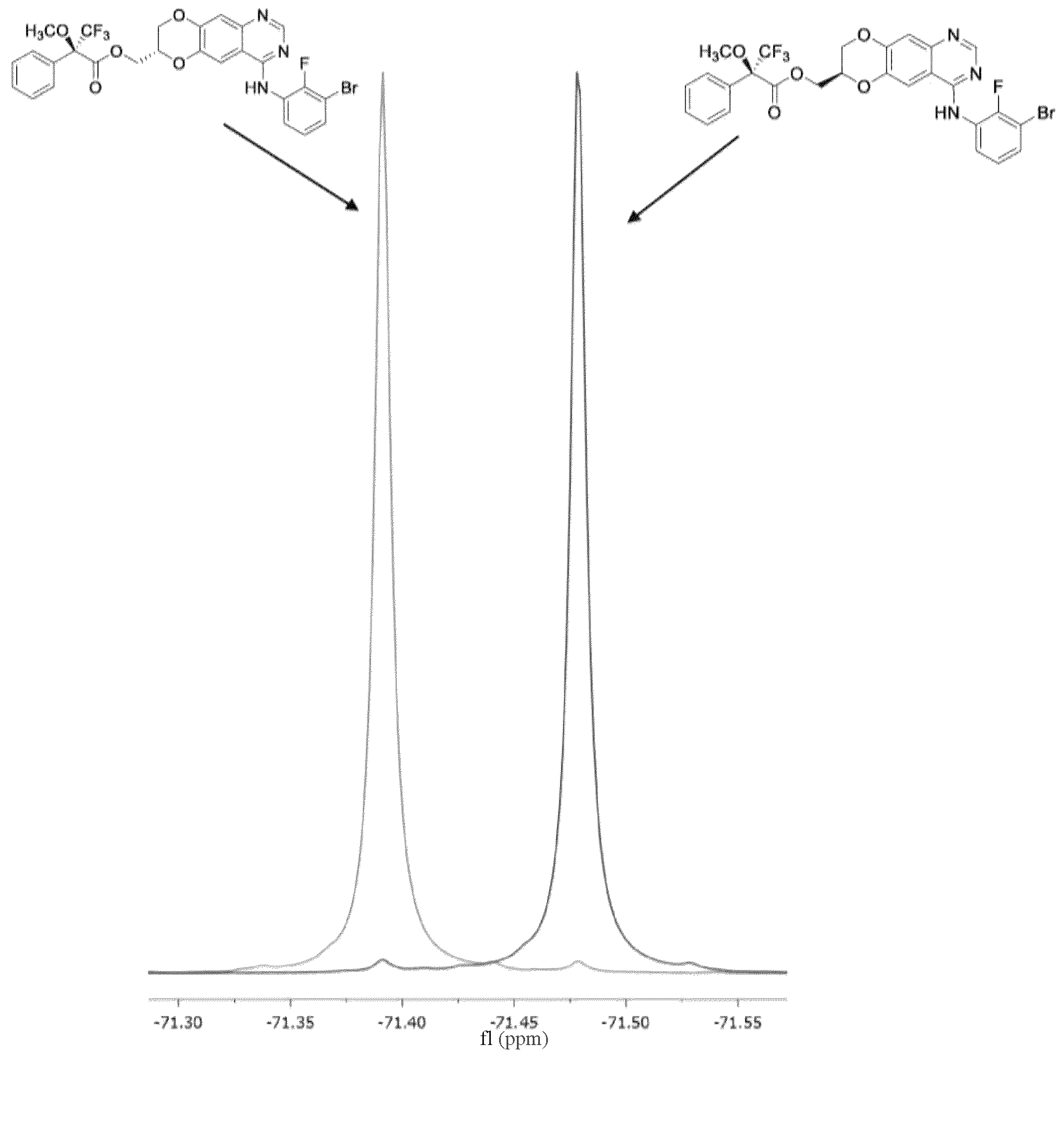

CCP32F3.tmp.DAT - HP1100 DAD сигнал B
(S)-5
HO
O
O
N
N
HN
F
Br
STH 1000000.00
SPW 0.20
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
Мин.
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220

ФИГ. 39C

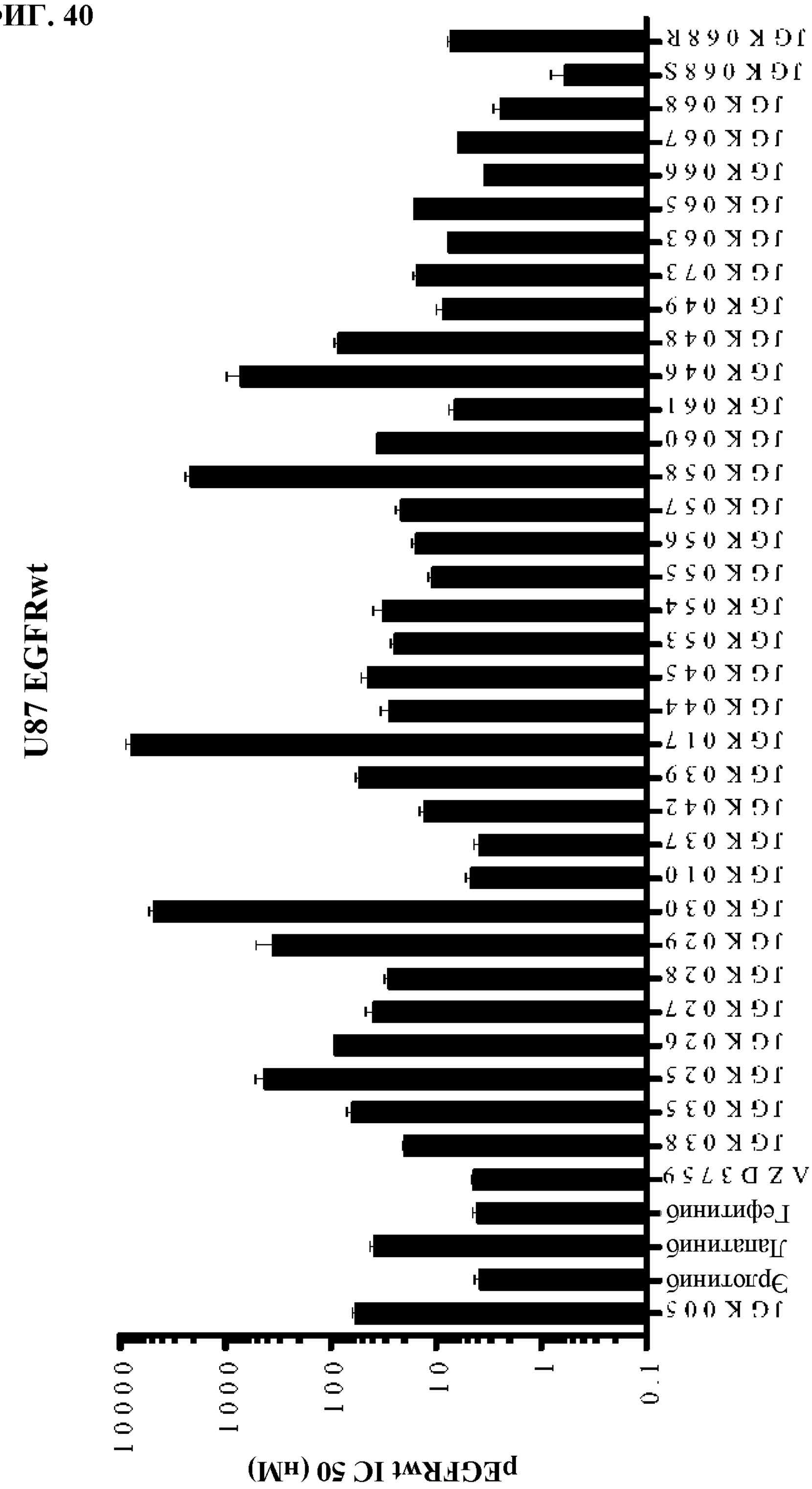


CCP32F2.tmp.DAT - HP1100 DAD сигнал B
(R)-5
HO
O
O
N
N
HN
F
Br
SPW 0.20
STH 1000000.00
Мин.
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
1
0
-5
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30

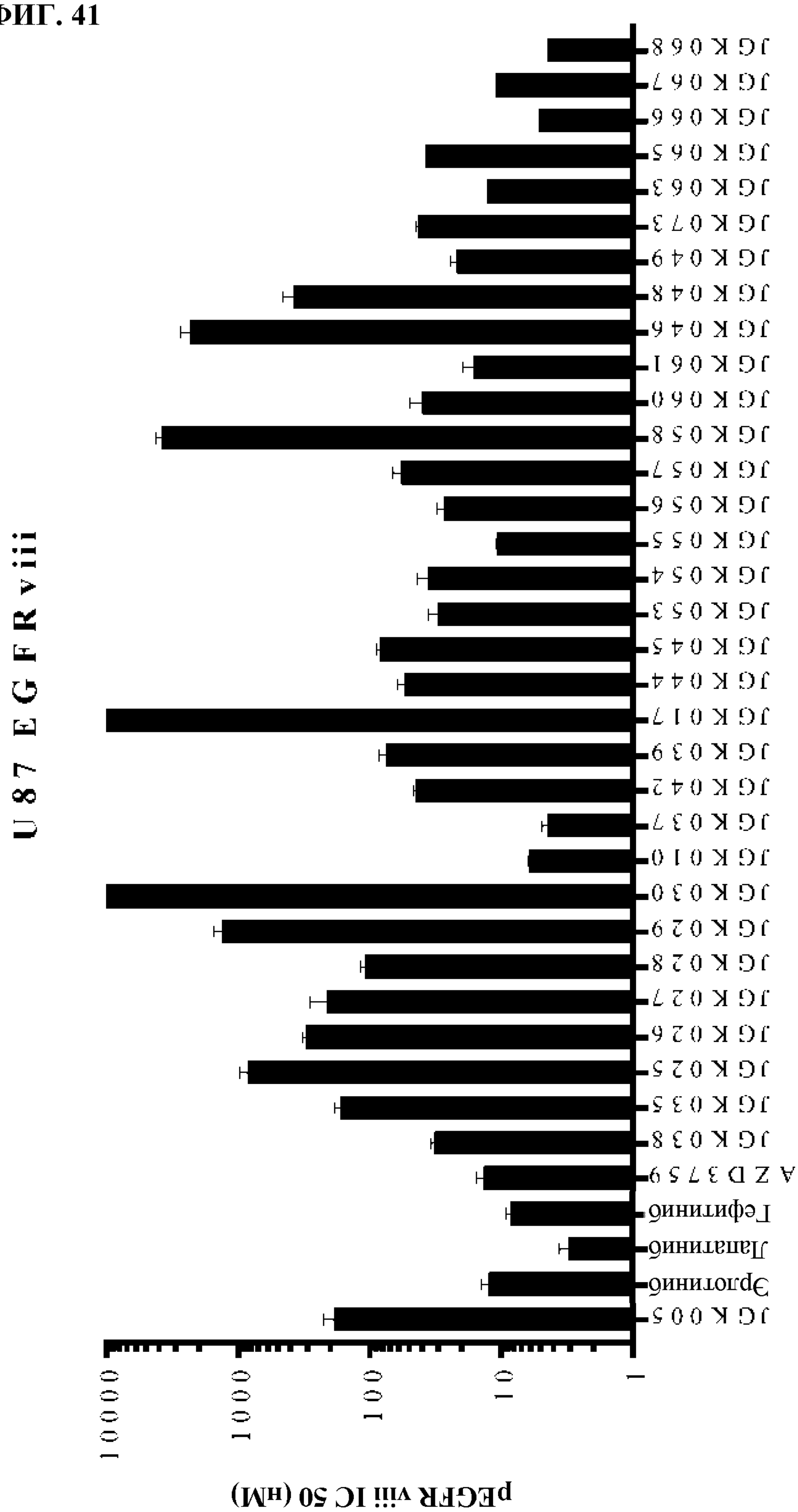
ФИГ. 39D



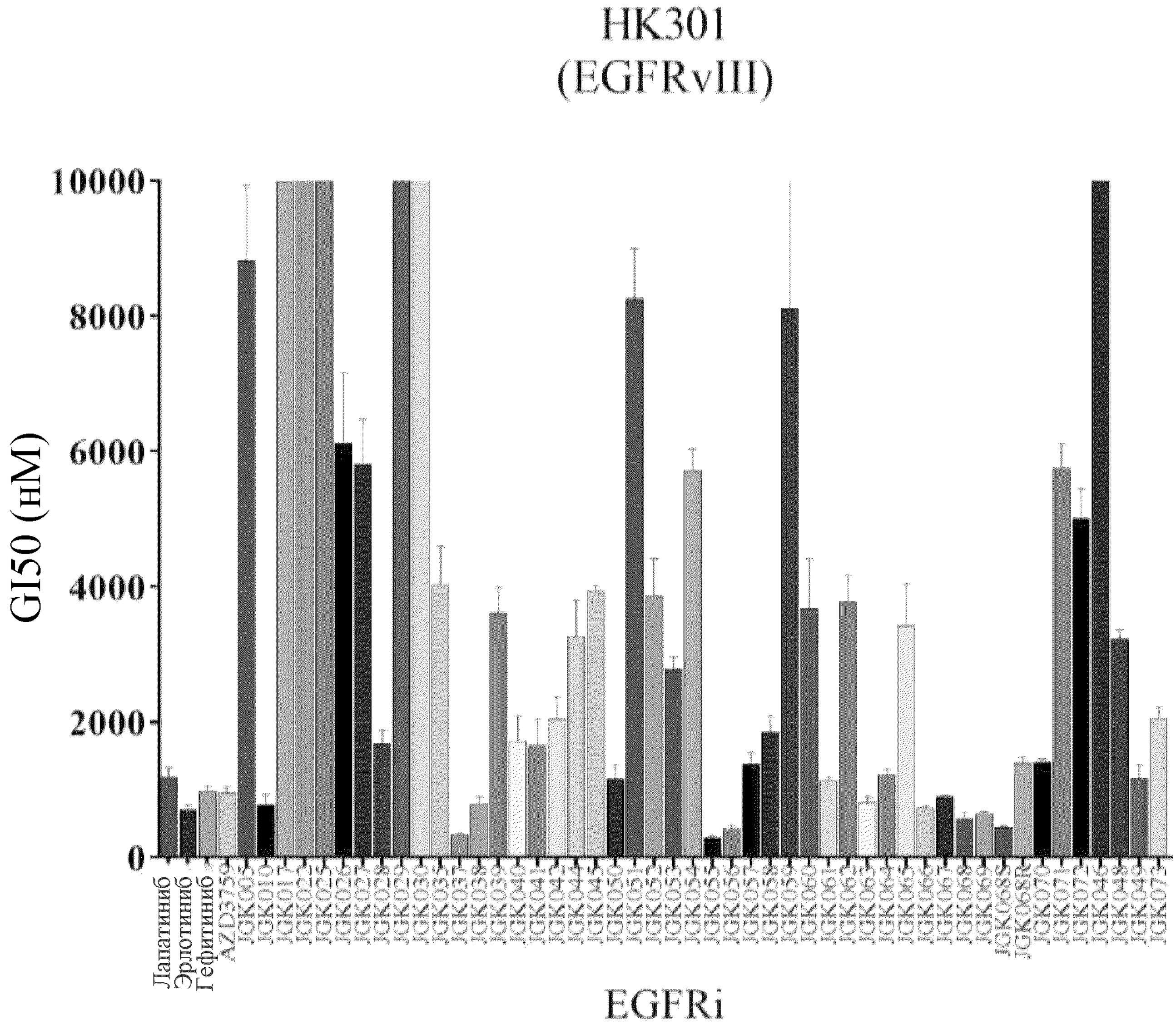
ФИГ. 40


U87 EGFRwt
pEGFRwt IC 50 (нМ)
0.1
1
10
100
1000
10000
JGK005
Эрлотиниб
Лапатиниб
Гефитиниб
AZD3759
JGK038
JGK035
JGK025
JGK026
JGK027
JGK028
JGK029
JGK030
JGK010
JGK037
JGK042
JGK039
JGK017
JGK044
JGK045
JGK053
JGK054
JGK055
JGK056
JGK057
JGK058
JGK060
JGK061
JGK046
JGK048
JGK049
JGK073
JGK063
JGK065
JGK066
JGK067
JGK068
JGK068S
JGK068R

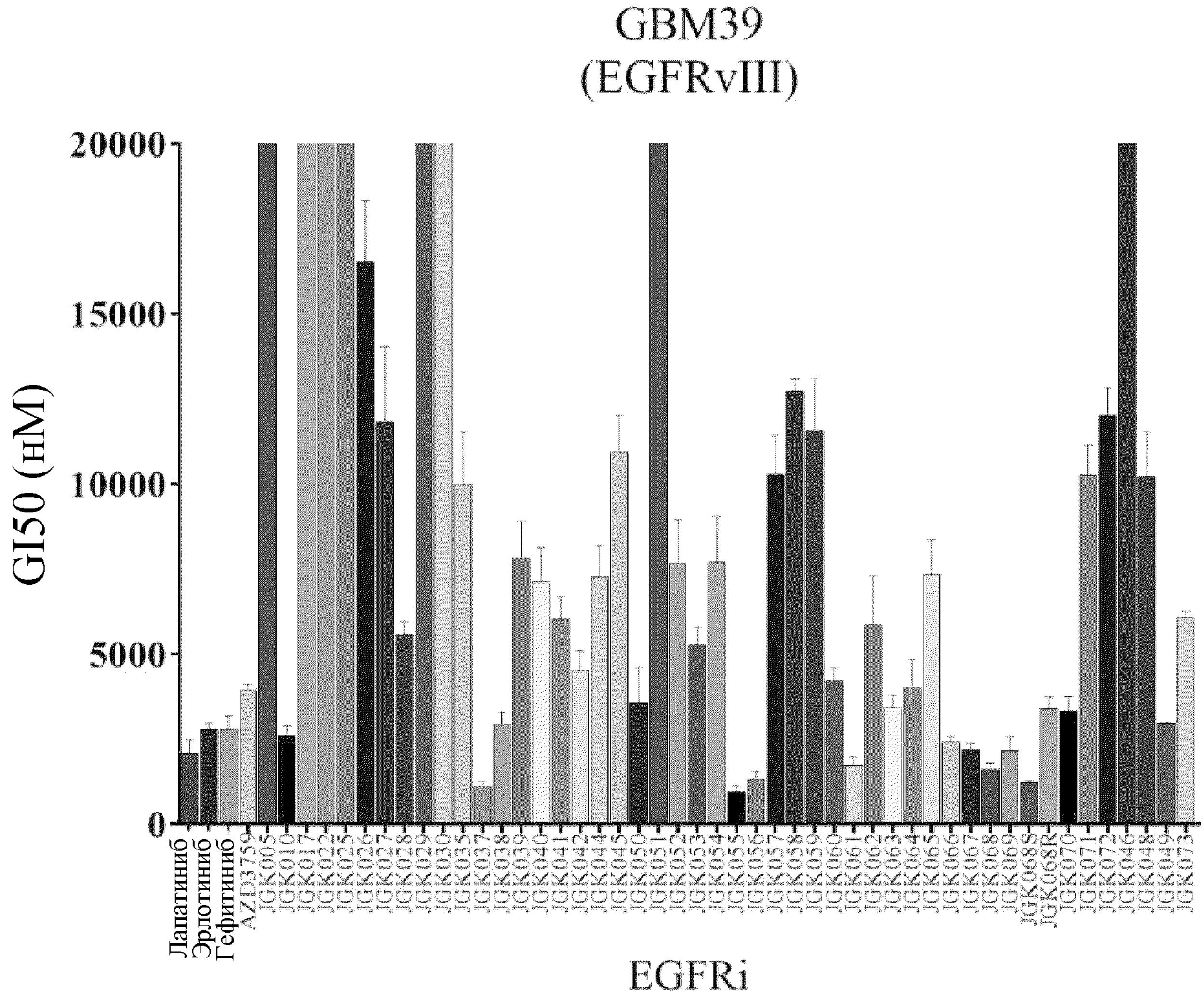
ФИГ. 41


U 87 E G F R v i i i
pEGFR viii IC 50 (нМ)
1
10
100
1000
10000
J G K 0 0 5
Эрлотиниб
Лапатиниб
Гефитиниб
A Z D 3 7 5 9
J G K 0 3 8
J G K 0 3 5
J G K 0 2 5
J G K 0 2 6
J G K 0 2 7
J G K 0 2 8
J G K 0 2 9
J G K 0 3 0
J G K 0 1 0
J G K 0 3 7
J G K 0 4 2
J G K 0 3 9
J G K 0 1 7
J G K 0 4 4
J G K 0 4 5
J G K 0 5 3
J G K 0 5 4
J G K 0 5 5
J G K 0 5 6
J G K 0 5 7
J G K 0 5 8
J G K 0 6 0
J G K 0 6 1
J G K 0 4 6
J G K 0 4 8
J G K 0 4 9
J G K 0 7 3
J G K 0 6 3
J G K 0 6 5
J G K 0 6 6
J G K 0 6 7
J G K 0 6 8

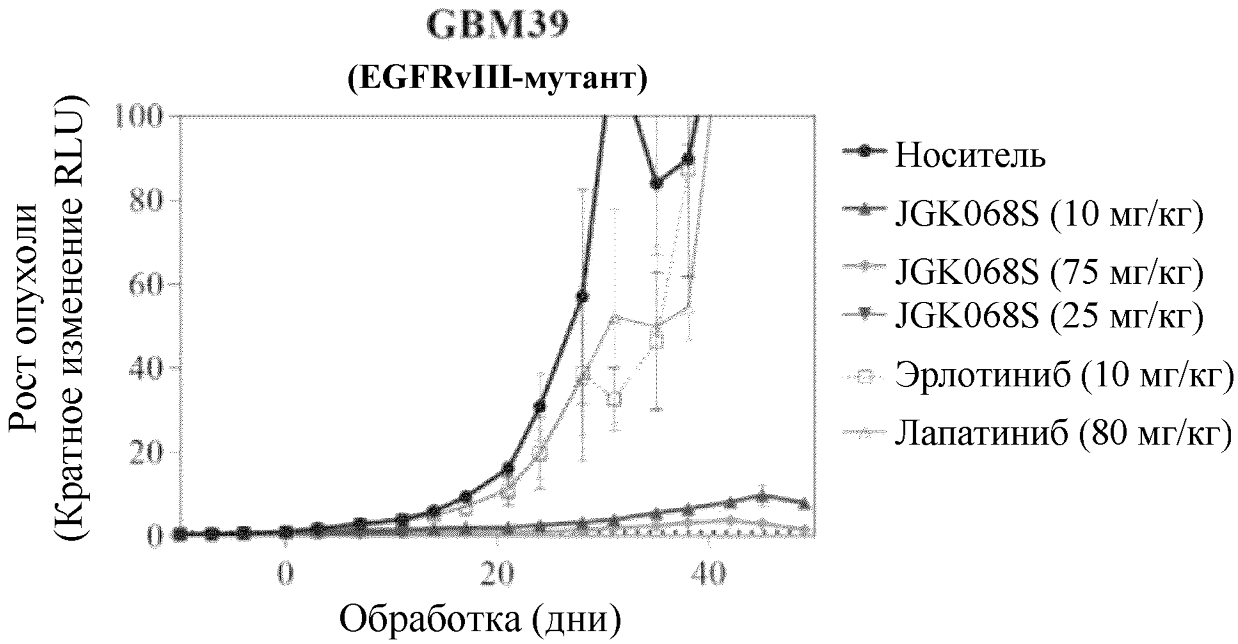
ФИГ. 42


HK301
(EGFRvIII)
GI50 (нМ)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Лапатиниб
Эрлотиниб
Гефитиниб
AZD3759
EGFRi

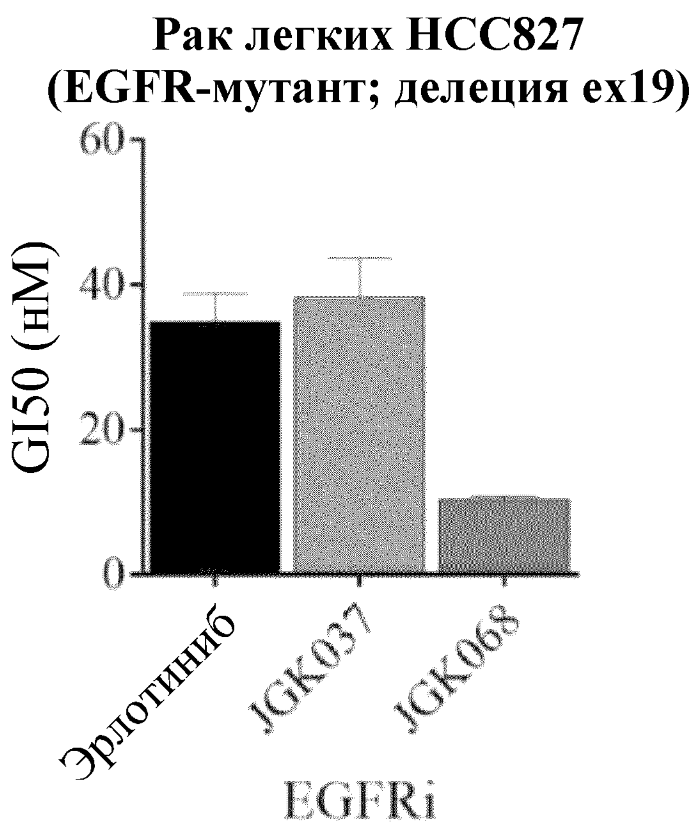
ФИГ. 43


GBM39
(EGFRvIII)
GI50 (нМ)
20000
15000
10000
5000
0
Лапатиниб
Эрлотиниб
Гефитиниб
AZD3759
JGK005
JGK010
JGK017
JGK022
JGK025
JGK026
JGK027
JGK028
JGK029
JGK030
JGK035
JGK037
JGK038
JGK039
JGK040
JGK041
JGK042
JGK044
JGK045
JGK050
JGK051
JGK052
JGK053
JGK054
JGK055
JGK056
JGK057
JGK058
JGK059
JGK060
JGK061
JGK062
JGK063
JGK064
JGK065
JGK066
JGK067
JGK068
JGK069
JGK068S
JGK068R
JGK070
JGK071
JGK072
JGK046
JGK048
JGK049
JGK073
EGFRi

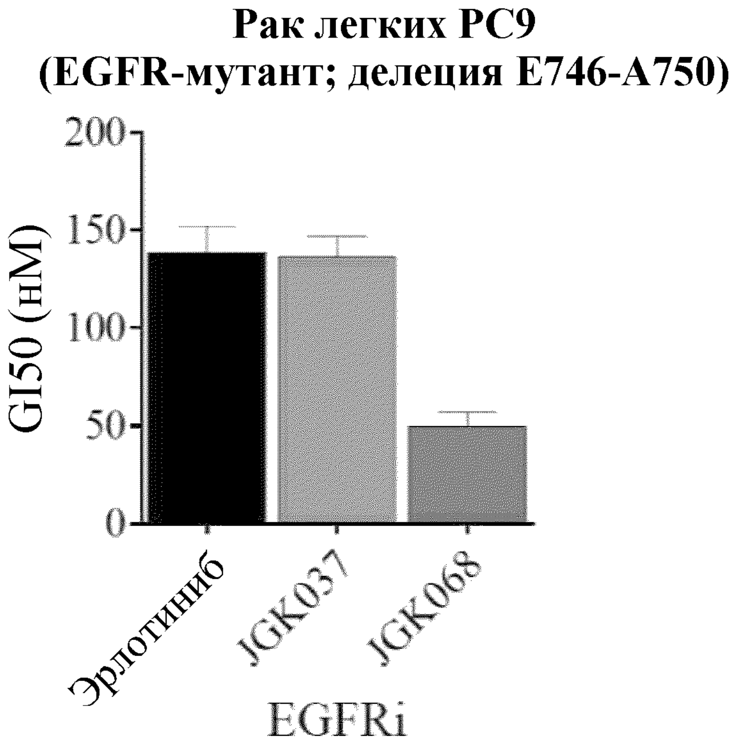
ФИГ. 44



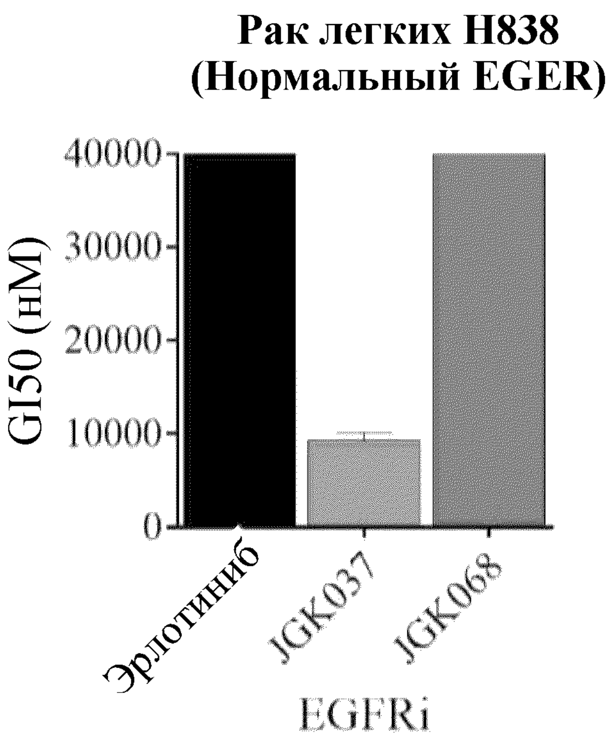
ФИГ. 45A



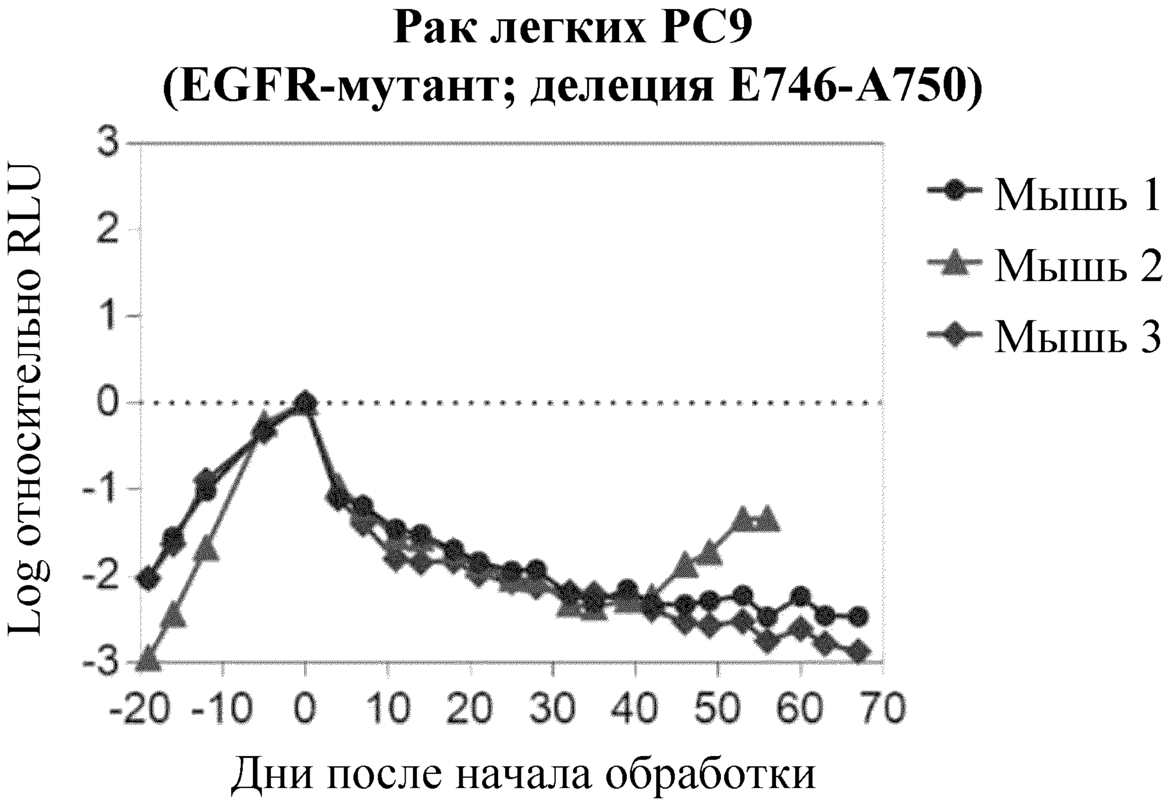
ФИГ. 45B



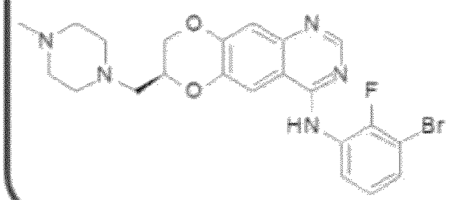
ФИГ. 45C



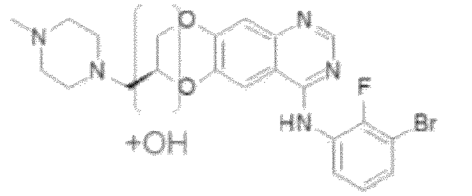
ФИГ. 46

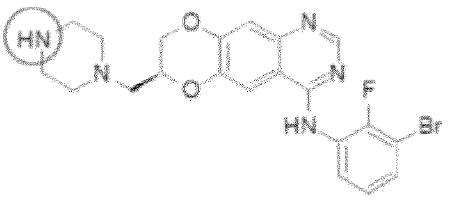

Рак легких PC9
(EGFR-мутант; делеция E746-A750)
Log относительно RLU
3
2
1
0
-1
-2
-3
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
Дни после начала обработки
Мышь 1
Мышь 2
Мышь 3

ФИГ. 47

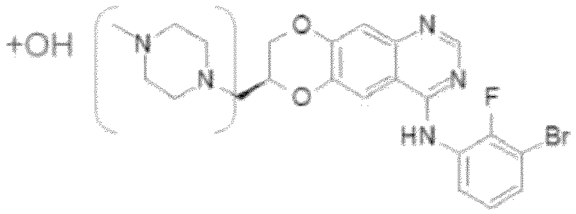
1. 

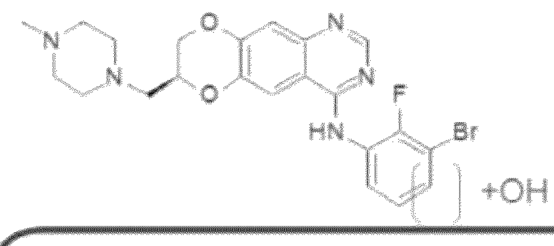
JCN068S

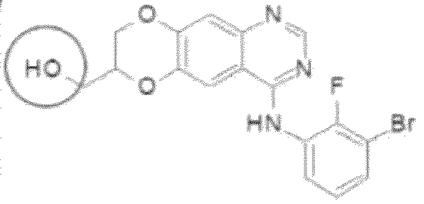
2. 

3. 

JCN083S

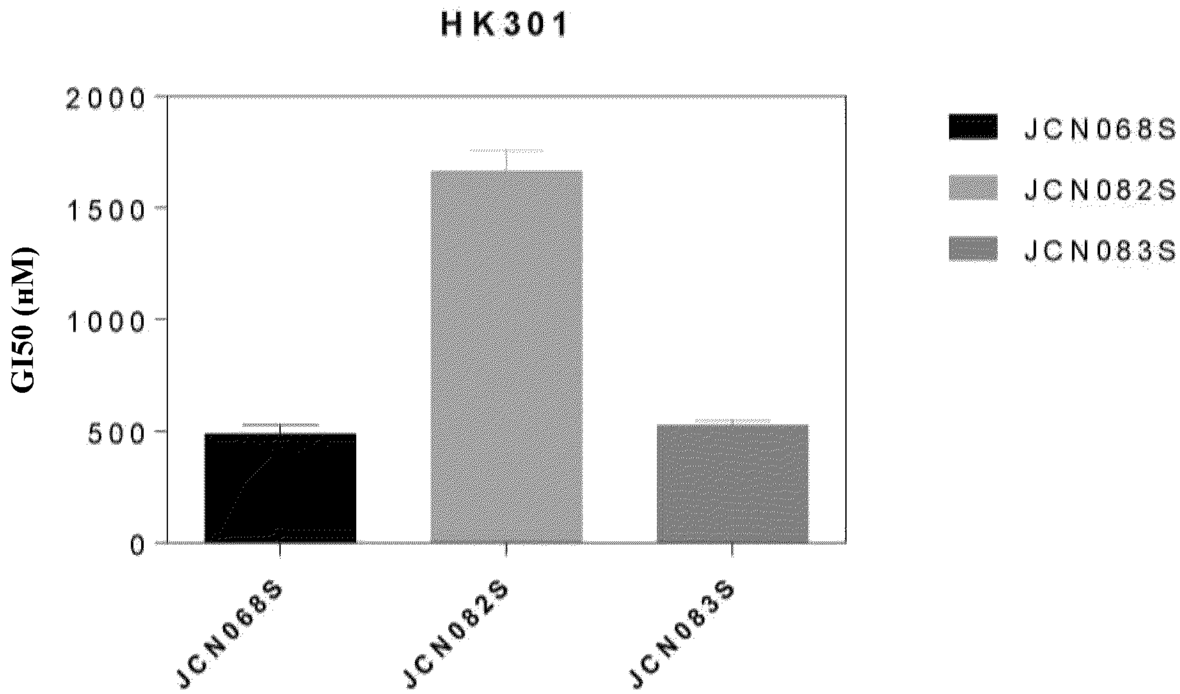
4. 

5. 

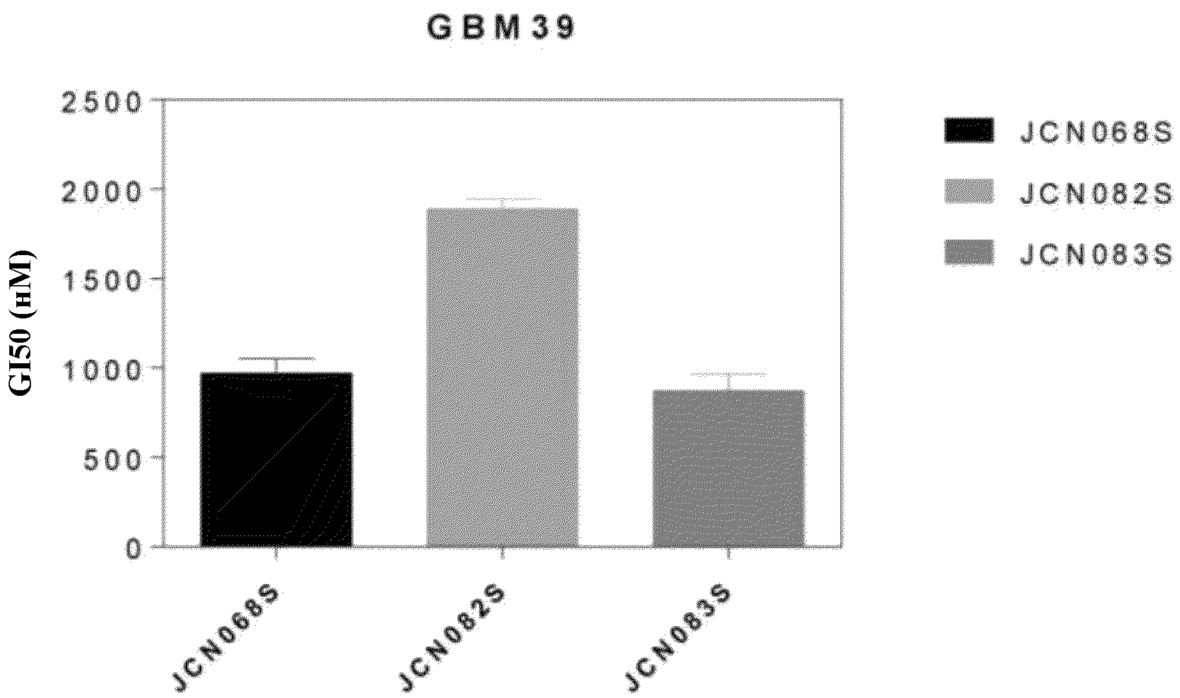
6. 

JCN082S

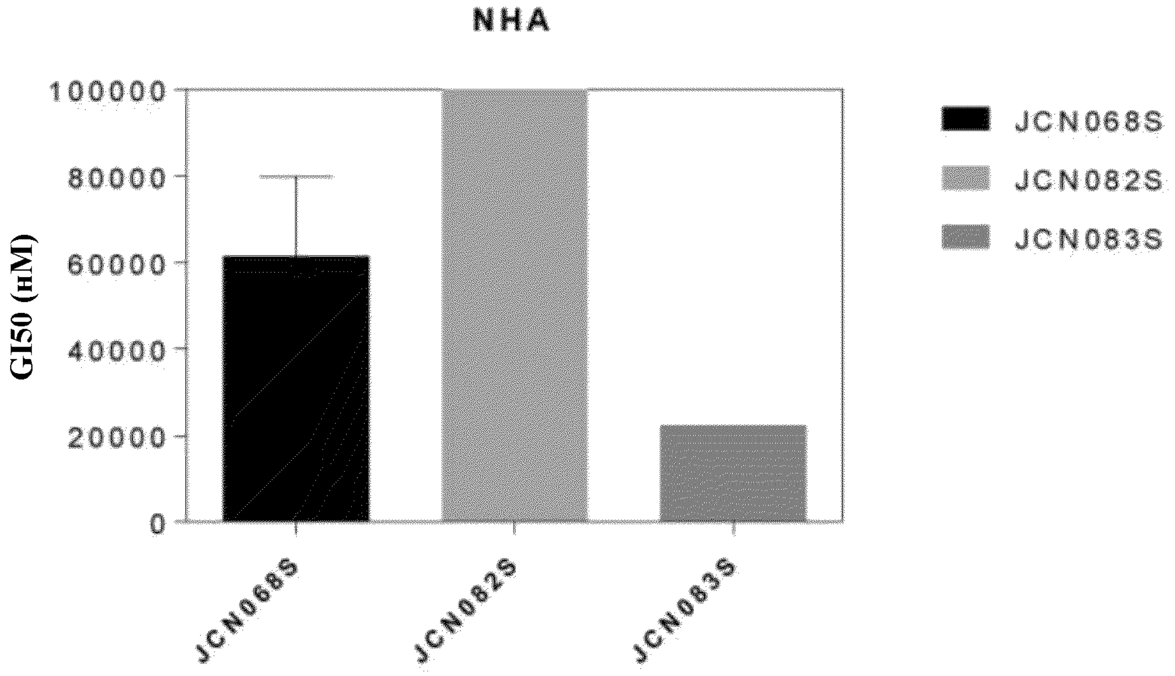
ФИГ. 48A



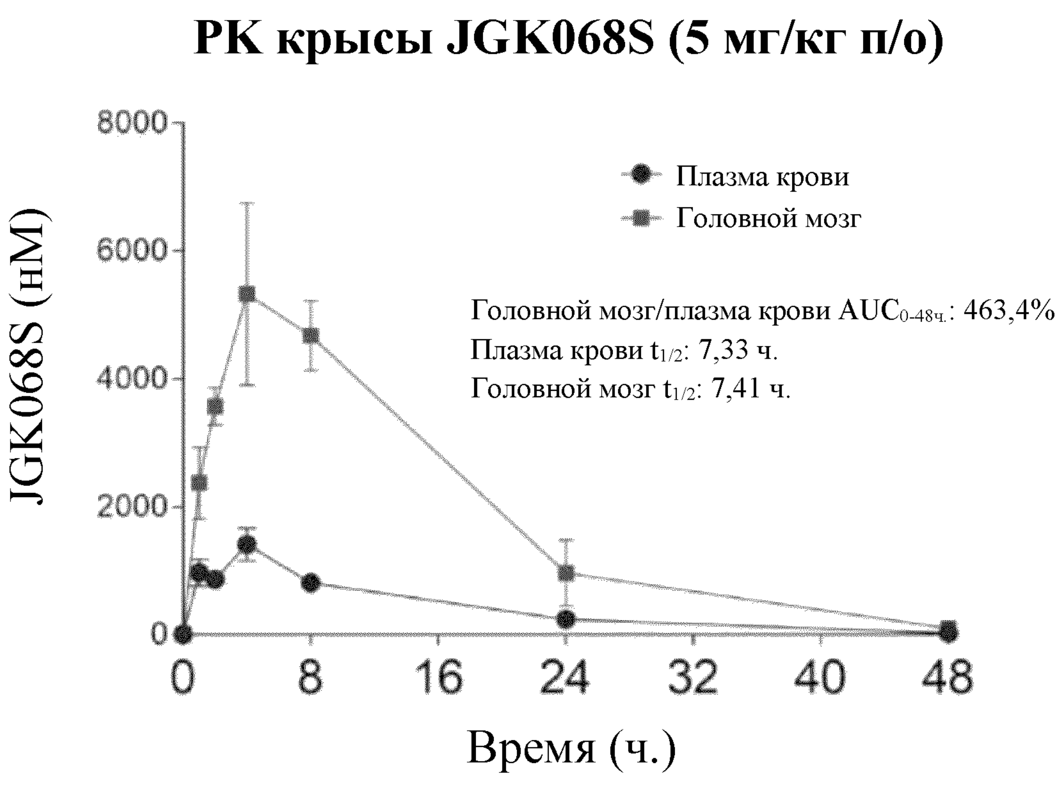
ФИГ. 48B



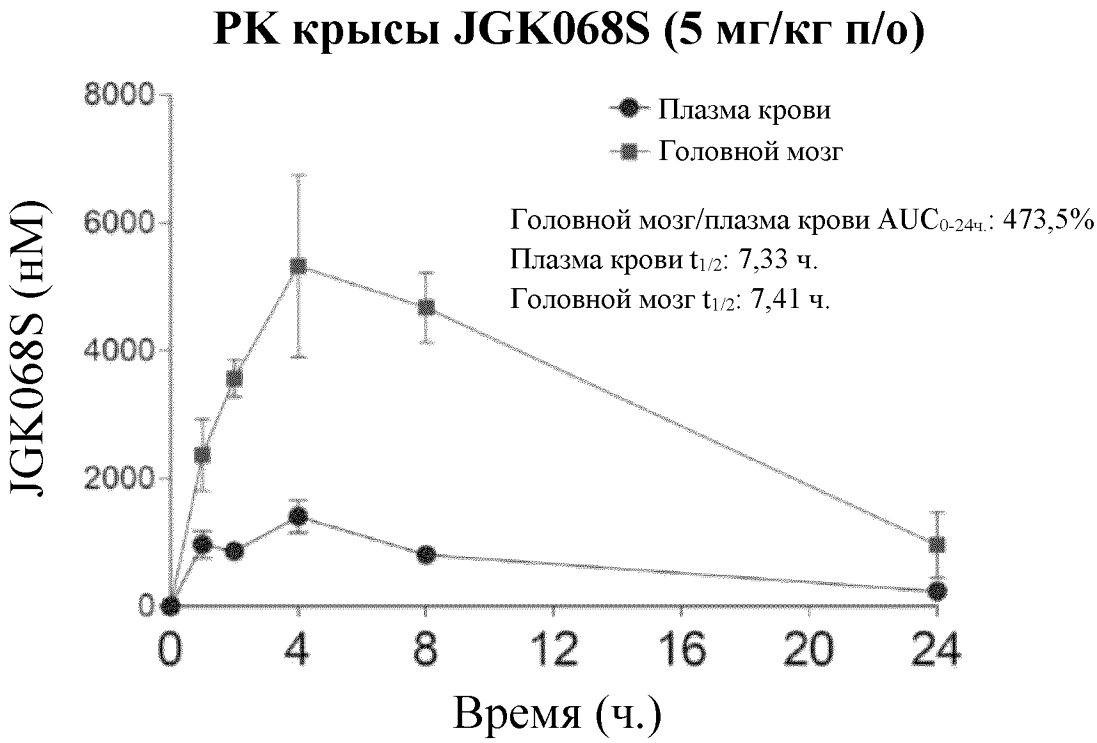
ФИГ. 48C



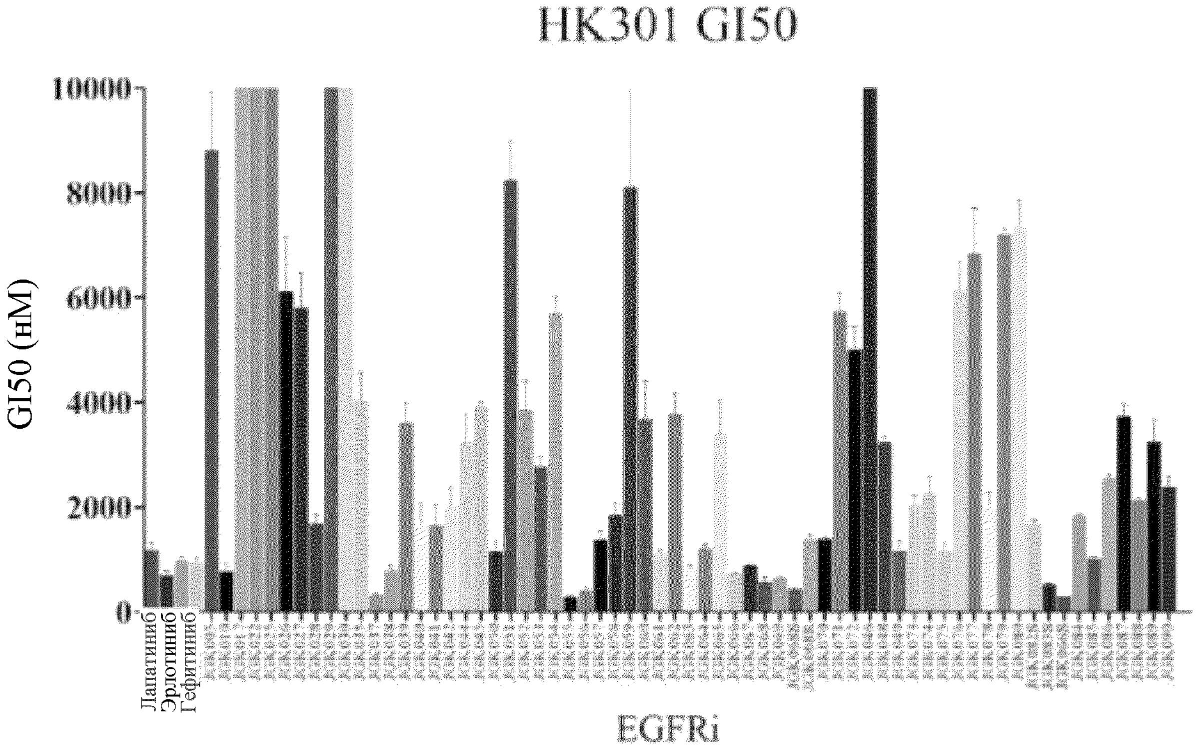
ФИГ. 49A



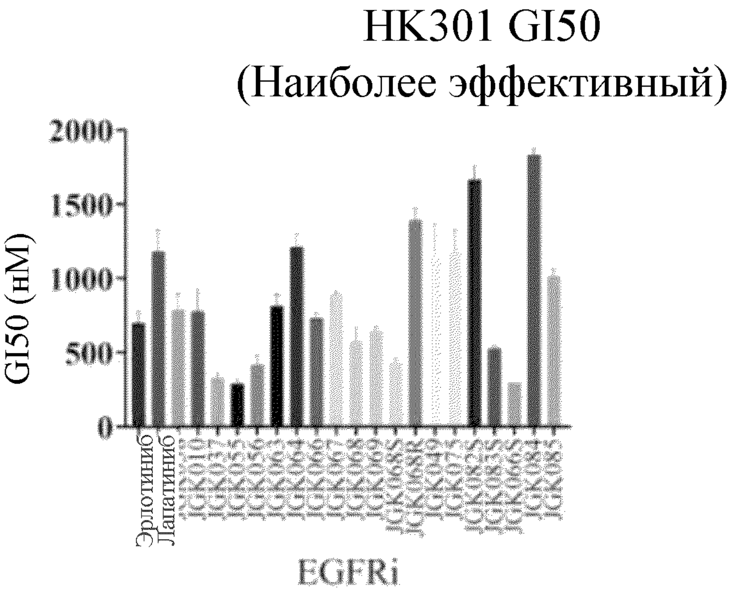
ФИГ. 49B


PK крысы JGK068S (5 мг/кг п/о)
Плазма крови
Головной мозг
Головной мозг/плазма крови $AUC_{0\text{-}24ч.}$: 473,5%
Плазма крови $t_{1/2}$: 7,33 ч.
Головной мозг $t_{1/2}$: 7,41 ч.
JGK068S (нМ)
8000
6000
4000
2000
0
0
4
8
12
16
20
24
Время (ч.)

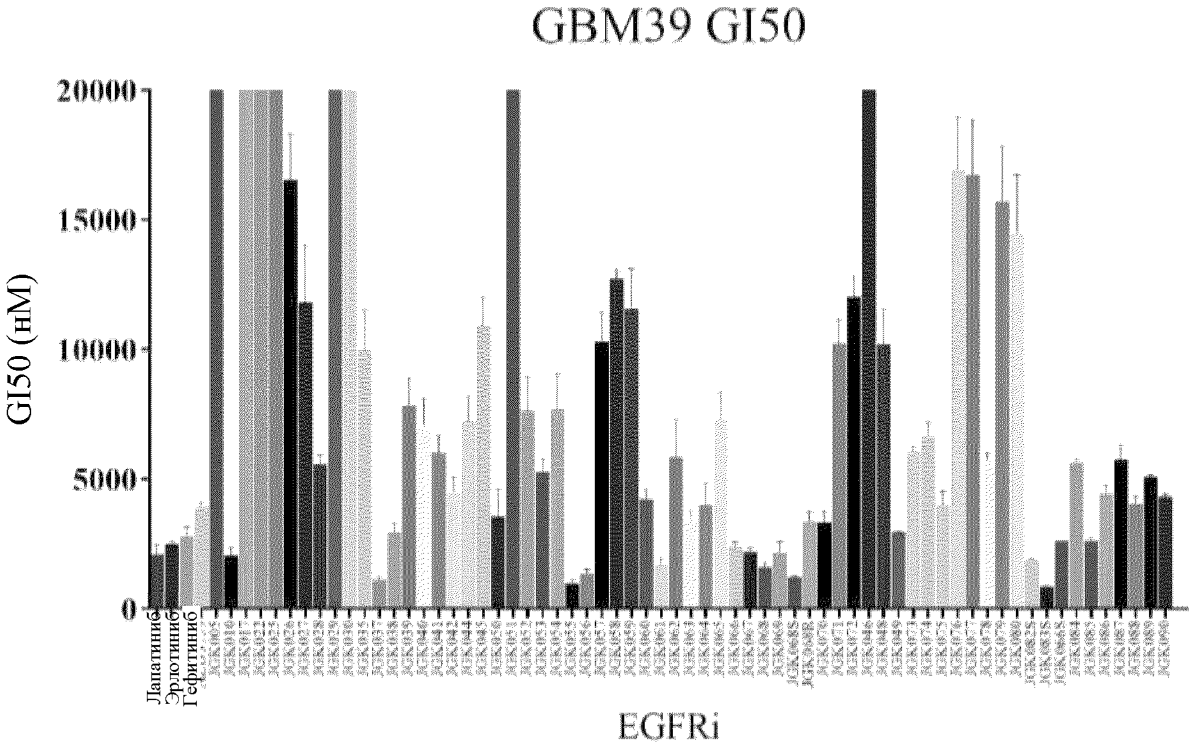
ФИГ. 50A



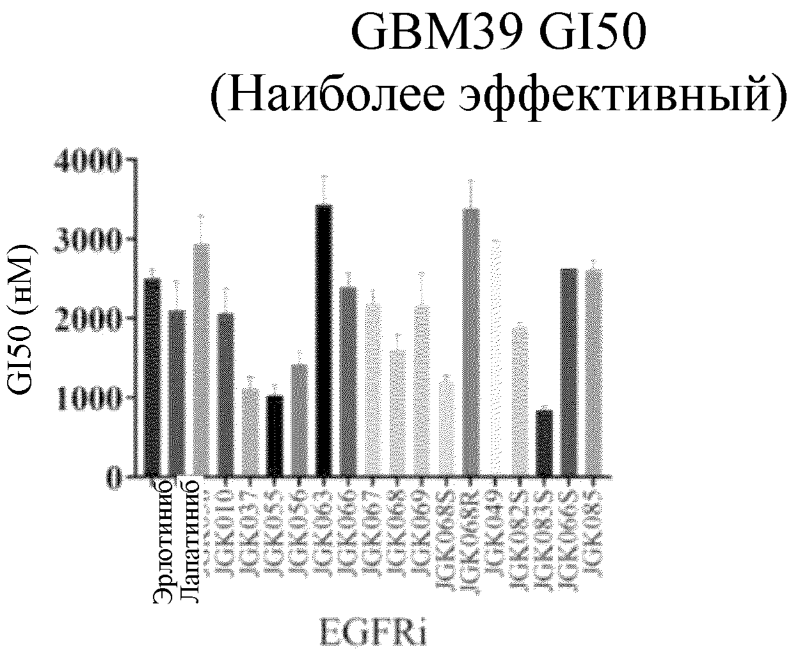
ФИГ. 50B



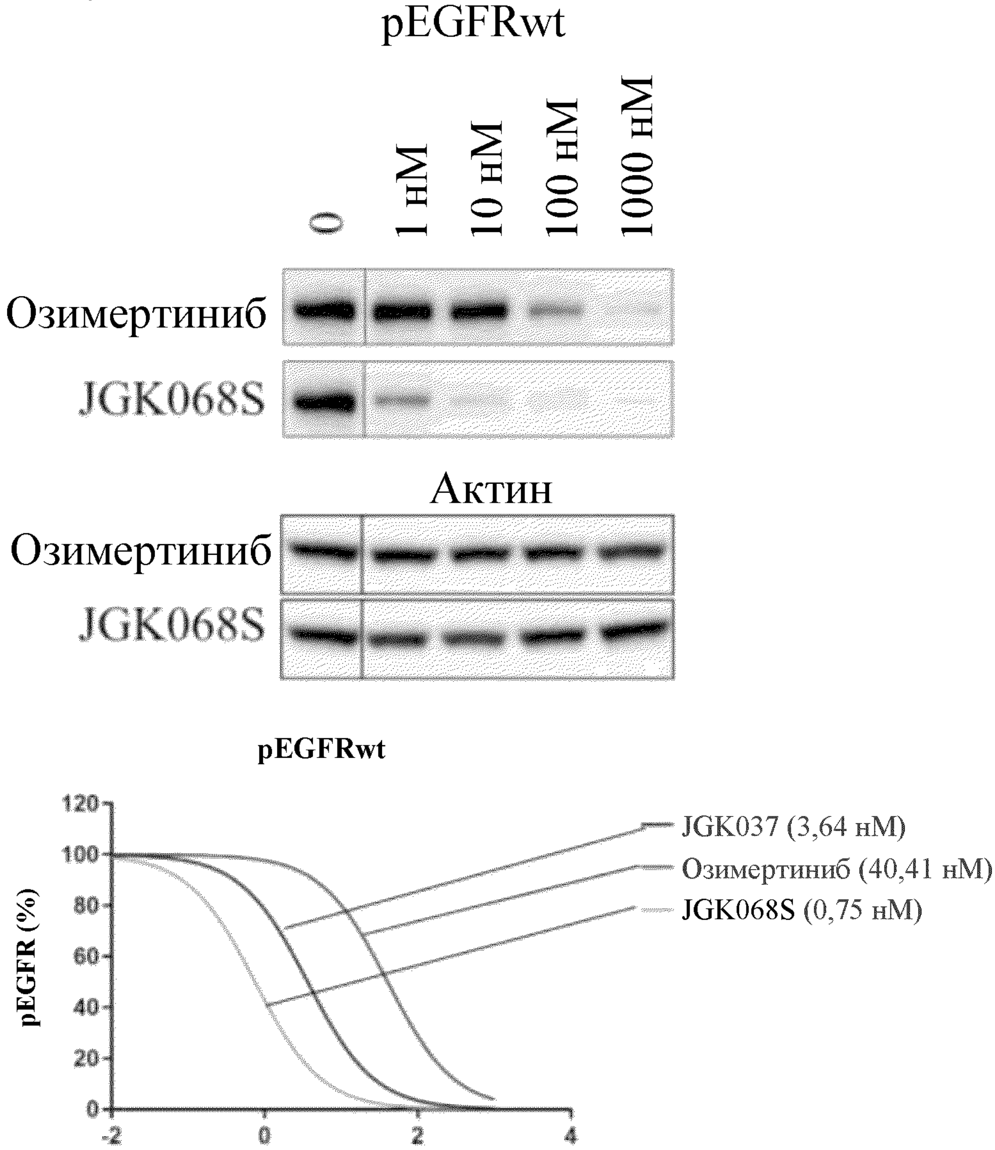
ФИГ. 51A



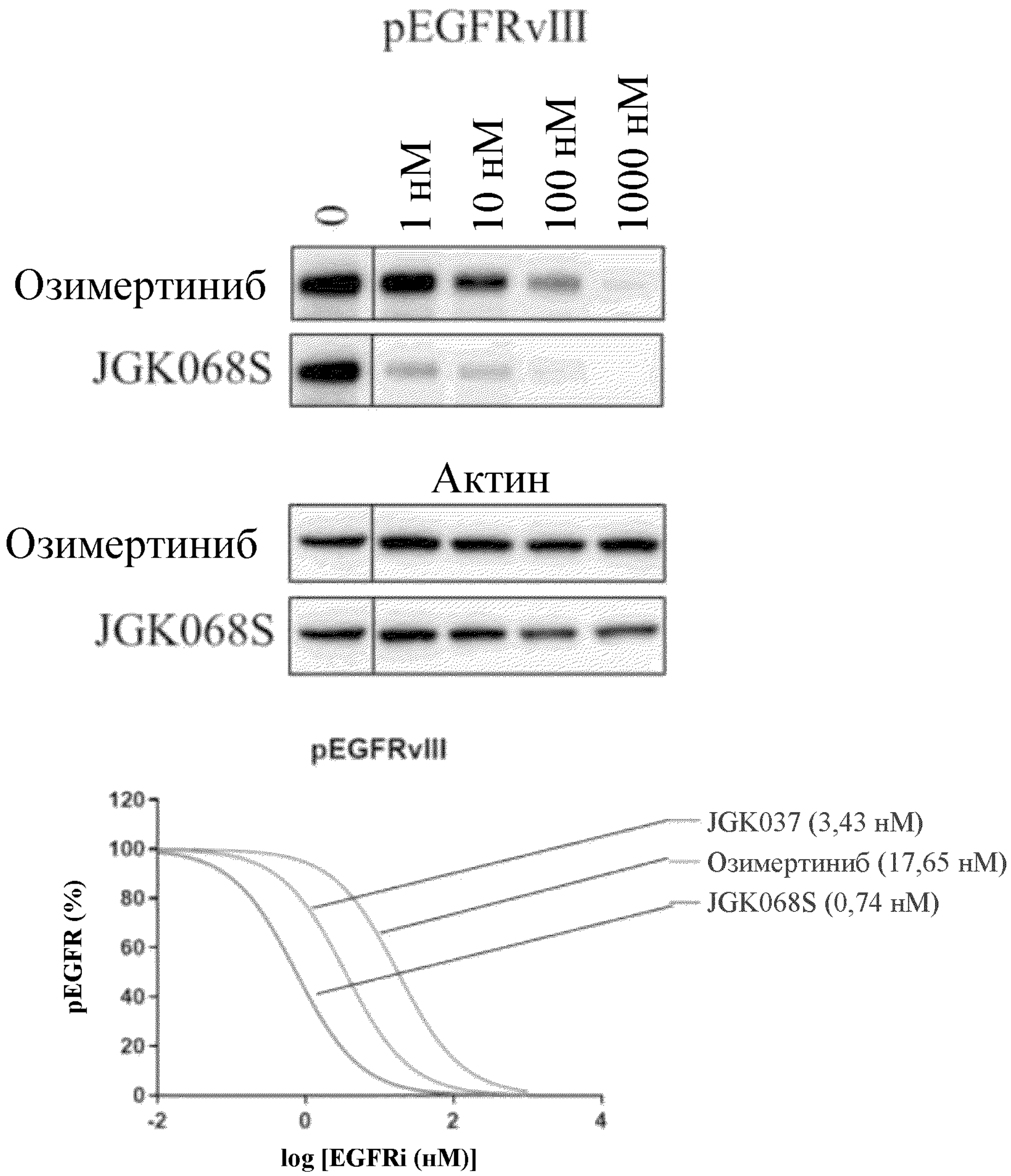
ФИГ. 51B



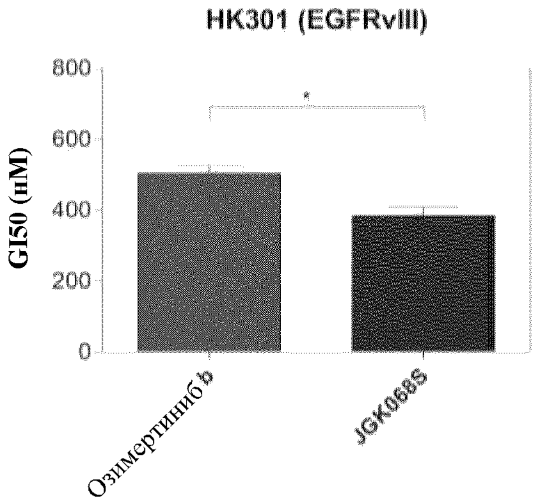
ФИГ. 52A


pEGFRwt
0
1 нМ
10 нМ
100 нМ
1000 нМ
Озимертиниб
JGK068S
Актин
Озимертиниб
JGK068S
pEGFRwt
120
100
80
60
40
20
0
-2
0
2
4
pEGFR (%)
log [EGFRi (нМ)]
JGK037 (3,64 нМ)
Озимертиниб (40,41 нМ)
JGK068S (0,75 нМ)

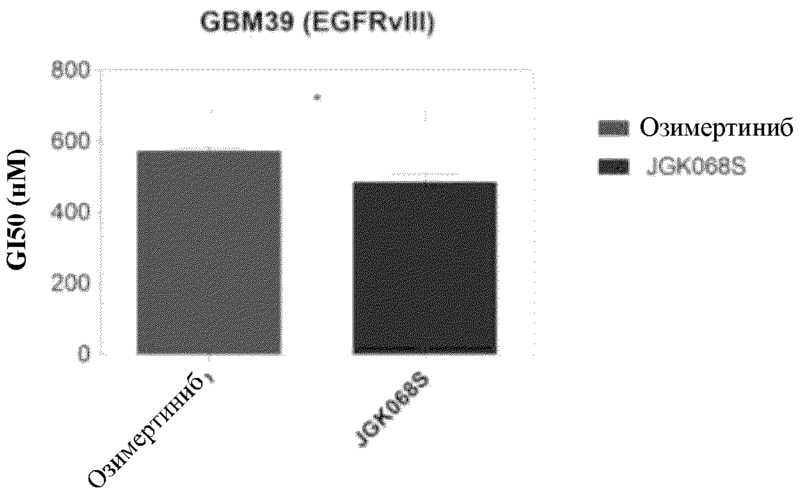
ФИГ. 52B


pEGFRvIII
0
1 нМ
10 нМ
100 нМ
1000 нМ
Озимертиниб
JGK068S
Актин
Озимертиниб
JGK068S
pEGFRvIII
120
100
80
60
40
20
0
pEGFR (%)
-2
0
2
4
log [EGFRi (нМ)]
JGK037 (3,43 нМ)
Озимертиниб (17,65 нМ)
JGK068S (0,74 нМ)

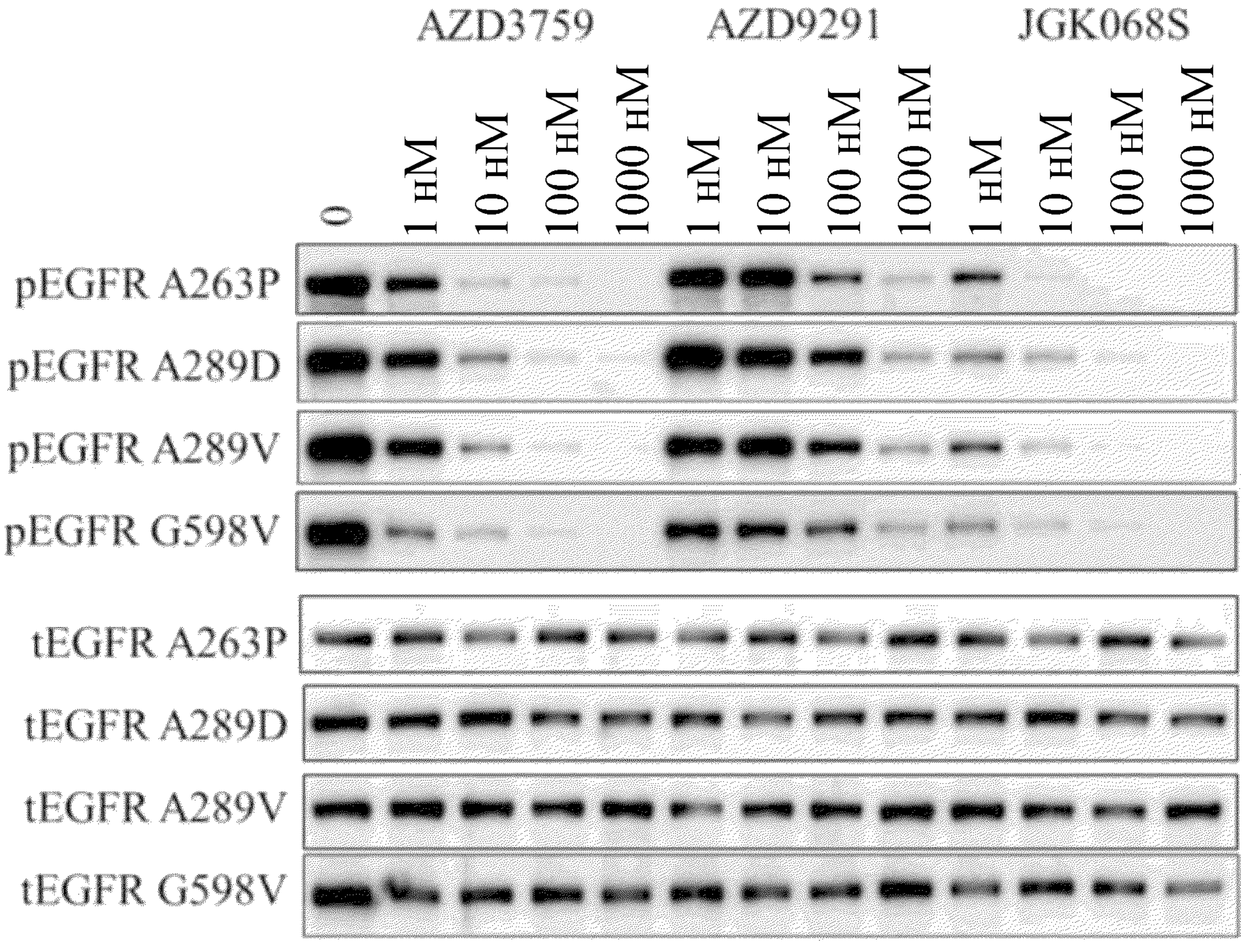
ФИГ. 53A



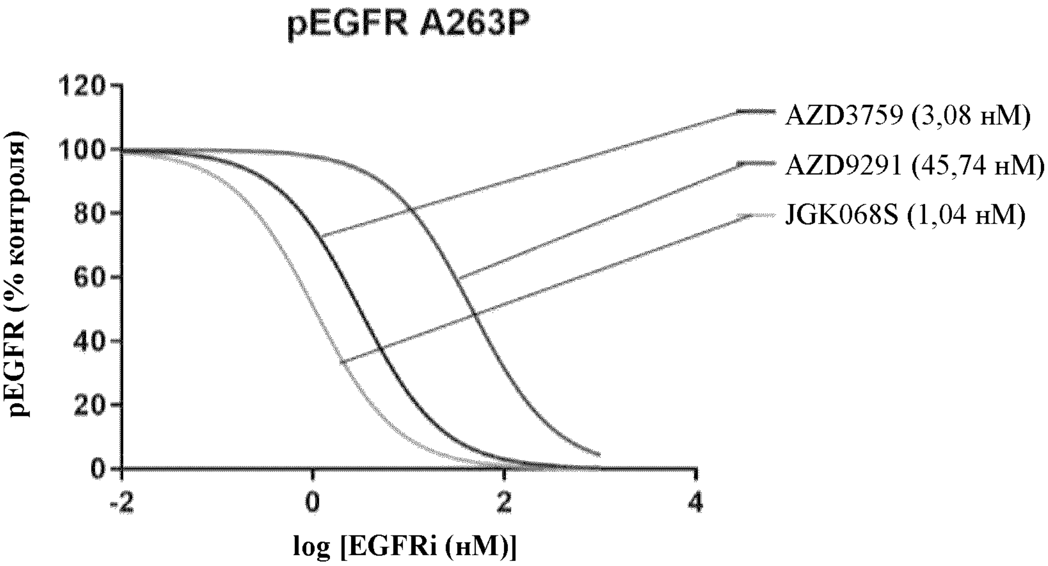
ФИГ. 53B



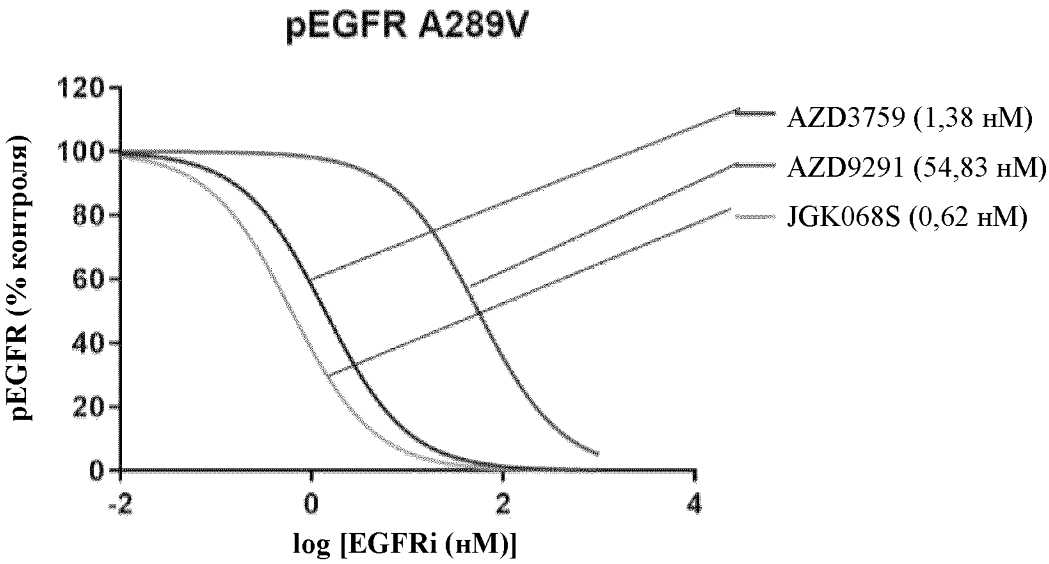
ФИГ. 54A


AZD3759
AZD9291
JGK068S
0
1 нМ
10 нМ
100 нМ
1000 нМ
1 нМ
10 нМ
100 нМ
1000 нМ
1 нМ
10 нМ
100 нМ
1000 нМ
pEGFR A263P
pEGFR A289D
pEGFR A289V
pEGFR G598V
tEGFR A263P
tEGFR A289D
tEGFR A289V
tEGFR G598V

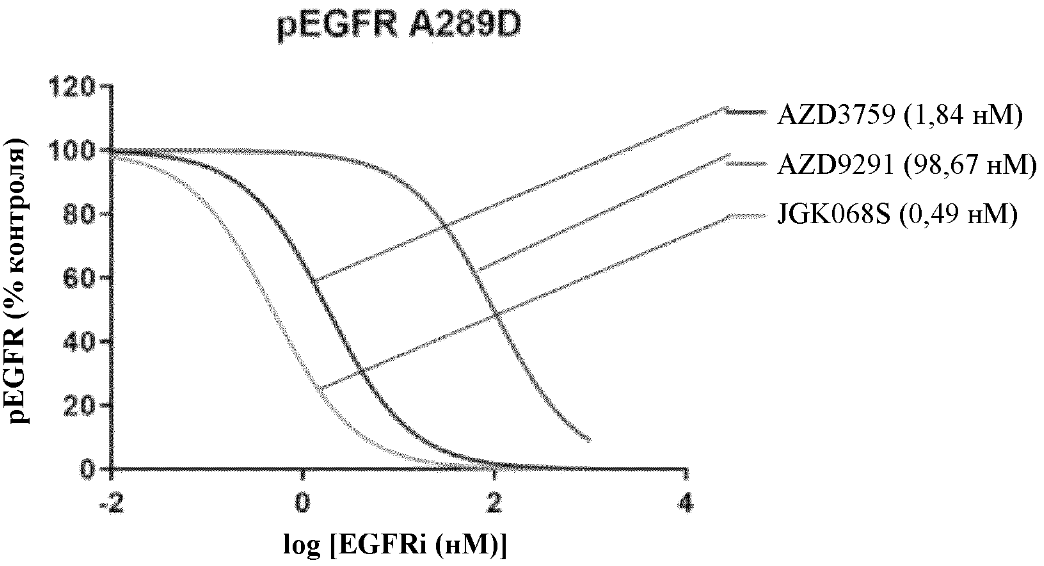
ФИГ. 54B



ФИГ. 54C



ФИГ. 54D



ФИГ. 54E