

Настоящее изобретение относится к новым химическим соединениям, в частности к замещенным пирролпиридинам, к содержащим их композициям и к применению этих соединений в качестве лекарственных средств.

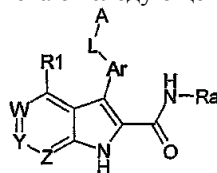
Более конкретно и в соответствии с первым аспектом изобретение относится к новым специфическим замещенным пирролпиридинам, обладающим противораковой активностью, опосредованной модуляцией активности белков, в частности киназ.

В настоящее время большинство имеющихся в продаже соединений, используемых в химиотерапии, создают серьезные проблемы в связи с возникновением побочных эффектов и переносимостью их пациентами. Эти эффекты можно было бы ограничить при условии, если бы используемые лекарственные средства селективно воздействовали на раковые клетки и не воздействовали на здоровые клетки. Следовательно, одно из решений, ограничивающих нежелательные побочные эффекты химиотерапии, может заключаться в применении лекарственных средств, действующих на метаболические пути или конститутивные элементы этих путей, экспрессирующихся большей частью в раковых клетках и не экспрессирующихся или экспрессирующихся в незначительной степени в здоровых клетках.

Белки-киназы представляют собой семейств ферментов, которые катализируют фосфорилирование гидроксильных групп в специфических остатках белков, таких как остатки тирозина, серина или треонина. Такое фосфорилирование может изменять в широких пределах функцию белков; таким образом, белки-киназы играют важную роль в регуляции разнообразных клеточных процессов, включая, в частности, метаболизм, клеточную пролиферацию, клеточную дифференциацию, миграцию клеток или продолжительность жизни клеток. Среди различных функций клеток, в которых задействована активность киназного белка, некоторые функции представляют интерес в качестве мишени для лечения раковых заболеваний, а также других болезней.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является композиция, обладающая противораковой активностью и одновременно воздействующая на киназы, в частности. Среди киназ, модуляция активности которых является целью изобретения, предпочтительны KDR и Tie2.

Соединения согласно изобретению отвечают следующей формуле (I)



Формула (I)

в которой

- 1) Ar представляет собой фенильную группу;
- 2) A представляет собой фенил, замещенный одной или двумя группами, выбранными из галогена, (C<sub>1-2</sub>)алкила, фторированного C<sub>1</sub>-алкила, O-C<sub>1</sub>алкила, фторированного O-C<sub>1</sub>алкила, NHCOCH<sub>3</sub>,
- 3) L представляет собой NH-CO-NH;
- 4) один из Y и Z выбирают из N и NO, а другой Y и Z обозначает C(R<sub>5</sub>), и W обозначает C(R<sub>6</sub>);
- 5) R<sub>1</sub>, R<sub>5</sub> и R<sub>6</sub> представляют собой H и
- 6) R<sub>a</sub> представляют собой H.

Заместитель L-A согласно изобретению может быть выбран из NH-CO-NH-A.

Заместитель A согласно изобретению может быть выбран фенила, необязательно замещенного.

Наиболее предпочтительным заместителем A является фенил.

Заместитель A предпочтительно замещен первым заместителем, выбираемым из группы, состоящей из алкила, галогенсодержащего алкила, O-алкила. Кроме того, A преимущественно замещен также вторым заместителем, выбираемым из группы, содержащей F, Cl, Br, I, OH.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения A обозначает фенил, замещенный по меньшей мере одной группой, выбираемой из галогена, (C<sub>1-2</sub>)алкила, галогенсодержащего C<sub>1</sub>алкила, O-C<sub>1</sub>алкила, галогенсодержащего O-C<sub>1</sub>алкила.

Соединения согласно изобретению могут находиться в форме:

- 1) нехиральной, или
- 2) рацемической, или
- 3) обогащенной стереоизомером, или
- 4) обогащенной энантиомером и, возможно, в форме соли.

Соединение согласно изобретению может быть использовано для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения патологического состояния, в частности рака.

Настоящее изобретение относится также к лекарственному средству, содержащему соединение согласно изобретению, и к терапевтическим композициям, содержащим соединение согласно изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым эксципиентом, пригодным для выбранного способа введения. Фармацевтическая композиция может находиться в твердой, жидкой или липосомной форме.

Из твердых композиций можно назвать порошки, желатиновые капсулы, таблетки. Формы для перорального приема могут также включать твердые формы, защищенные от кислой среды желудка. Используемые носители для твердых форм представляют собой, в частности, минеральные носители, такие как фосфаты, карбонаты, или органические носители, такие как лактоза, целлюлозы, крахмал или полимеры. Жидкие формы представляют собой растворы, суспензии или дисперсии. Они содержат в качестве диспергирующего носителя либо воду, либо органический растворитель (этанол, NMP или другие растворители) или смеси поверхностно-активных веществ с растворителями или комплексообразующих веществ с растворителями.

Жидкие формы, предпочтительно, являются формами для инъекций и поэтому их состав подбирается именно для такого применения.

Приемлемые способы введения путем инъекций включают внутривенный, интраперитонеальный, внутримышечный и подкожный способы, обычно предпочитают внутривенный способ введения.

Вводимая доза соединений согласно изобретению подбирается врачом в зависимости от способа введения лекарства пациенту и от его состояния.

Соединения согласно настоящему изобретению могут вводиться индивидуально или в смеси с другими противораковыми веществами. Из возможных ассоциаций можно назвать следующие:

алкилирующие агенты, в частности циклофосфамид, мелфалан, ифосфамид, хлорамбуцил, бусульфид, тиотепа, преднимустин, кармустин, ломустин, семустин, стептозотозин, декарбазин, темозоломид, прокарбазин и гексаметилмеламин,

производные платины, такие, в частности, как цисплатин, карбоплатин или оксалиплатин,

антибиотики, такие, в частности, как блеомицин, митомицин, дактиномицин,

агенты, обладающие активностью против микротрубочек, такие, в частности, как винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, таксоиды (паклитаксел и докетаксел),

антрациклины, такие, в частности, как доксорубин, даунорубин, идарубин, эпирубин, митоксантрон, лозоксантрон,

ингибиторы топоизомераз групп I и II, такие как этопозид, тенипозид, амсакрин, иринотекан, топо-текан и томудекс,

фторпиримидины, такие как 5-фторурацил, UFT, флоксурин,

аналоги цитидина, такие как 5-азацидин, цитарабин, гемцитабин, 6-меркаптомурин, 6-тиогуанин,

аналоги аденозина, такие как пентостатин, цитарабин или фосфат флударабина,

метотрексат и фолиновая кислота,

ферменты и другие соединения, такие как L-аспарагиназа, гидроксикарбамид, транс-ретиноевая кислота, сурамин, дексразоксан, амифостин, герсептин, а также эстрогенные гормоны, андрогенные гормоны,

сосудистые агенты, такие как производные комбретастина, например, CA4P, халконов или колхицина, например, ZD6126, и пролекарства этих веществ.

Можно также комбинировать прием соединений согласно изобретению с лечением рентгенотерапией. Эти виды лечения можно применять одновременно, отдельно или последовательно. Схему лечения подбирает врач в зависимости от особенностей больного, находящегося на лечении.

Соединения согласно изобретению полезны в качестве агентов-ингибиторов реакций, катализируемых киназой, в частности киназой FAK, KDR, Tie2, Aurora A, Aurora B и CDK2. Киназы FAK, KDR и Tie2 являются киназами, к которым особенно применимы соединения согласно изобретению в качестве ингибиторов.

Причины, по которым были выбраны эти киназы, следующие.

#### ФАК

ФАК является цитоплазмической тирозинкиназой, играющей важную роль в передаче сигнала интегринами, относящимися к семейству гетеродимерных рецепторов клеточной адгезии. FAK и интегрин солокализуются в перимембранных структурах, называемых адгезивными бляшками. Было показано на многочисленных типах клеток, что активация FAK, а также фосфорилирование ею остатков тирозина, в частности, ее аутофосфорилирование по тирозину 397, зависит от связи интегринов с их внеклеточными лигандами и, следовательно, индуцируется в процессе клеточной адгезии [Kornberg L, et al., J. Bio. Chem. 267(33): 23439-442, (1992)]. Аутофосфорилирование FAK-киназы по тирозину 397 происходит в сайте связывания с другой тирозинкиназой, Src, через ее SH2-домен [Schaller et al., Mol. Cell. Biol. 14:1680-1688, 1994; Xing et al., Mol. Cell. Biol. 5:413-421, 1994]. Src может в этом случае фосфорилировать FAK по тирозину 925, привлекая, таким образом, адаптивный белок Grb2 и индуцируя в некоторых клетках активацию пути *ras*- и MAP-киназы, участвующей в контроле пролиферации клеток [Schlaepfer et al., Nature; 372:786-791, 1994; Schlaepfer et al., Prog. Biophys. Mol. Biol. 71:435-478. 1999; Schlaepfer and Hunter, J. Biol. Chem. 272:13189-13195. 1997]. Активация FAK может также индуцировать сигнальный путь NH<sub>2</sub>-концевой киназы *jun* (JNK) и привести к продвижению клеток к фазе G1 клеточного цикла [Oktay et al., J. Cell. Biol. 145:1461-1469. 1999]. Фосфатидилинозит-3-OH-киназа (PI3-киназа) связывается также с FAK на тирозине 397, и это взаимодействие могло бы быть необходимо для активации PI3-киназы [Chen and Guan, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91:10148-10152. 1994; Ling et al., J. Cell. Biochem. 73:533-544. 1999].

Комплекс FAK/Src фосфорилирует различные субстраты, такие как паксиллин и p130CAS в фибробластах [Vuori et al., *Mol. Cell. Biol.* 16:2606-2613, 1996].

Результаты многочисленных исследований подтверждают гипотезу о том, что ингибиторы FAK могли бы быть полезны при лечении рака. Исследования предполагают, что FAK, по-видимому, играет важную роль в пролиферации и/или продолжительности жизни клеток *in vitro*. Например, некоторые авторы показали на клетках CHO, что сверхэкспрессия p125FAK приводит к ускорению перехода из фазы G1 в фазу S, предполагая при этом, что p125FAK благоприятствует клеточной пролиферации [Zhao J.-H et al., *J. Cell. Biol.* 143:1997-2008, 1998]. Другие авторы показали, что опухолевые клетки, обработанные антисмысловыми олигонуклеотидами FAK-киназы, теряют свою адгезию и вступают в стадию апоптоза (Xu et al., *Cell Growth Differ.* 4:413-418, 1996). Было также показано, что FAK ускоряет миграцию клеток *in vitro*. Таким образом, фибробласты, дефектные в отношении экспрессирования FAK (мыши с «нокаутом» FAK), имеют округленную морфологию, недостаточную миграционную способность клеток в ответ на хемотаксические сигналы, и эти недостатки устраняются путем ре-экспрессии FAK [DJ. Sieg et al., *J. Cell Science.* 112:2677-91, 1999]. Сверхэкспрессия C-концевого домена FAK (FRNK) блокирует распластывание адгезивных клеток и уменьшает миграцию клеток *in vitro* [Richardson A. and Parsons J.T. *Nature.* 380:538-540, 1996]. Сверхэкспрессия FAK в клетках CHO, COS или в клетках астроцитомы человека благоприятствует миграции клеток. Участие FAK в иницировании пролиферации и миграции многих типов клеток *in vitro* свидетельствует о потенциальной роли FAK в неопластических процессах. Последнее исследование наглядно доказало увеличение пролиферации опухолевых клеток *in vivo* после индуцирования экспрессии FAK в клетках астроцитомы человека [Cary L.A. et al., *J. Cell. Sci.* 109:1787-94, 1996; Wang D. et al., *J. Cell Sci.* 113:4221-4230, 2000]. Кроме того, иммуногистохимические анализы биопсийных материалов, взятых у человека, показали, что FAK сверхэкспрессируется в раковых клетках простаты, молочной железы, щитовидной железы, прямой кишки, меланомы, мозга и легких, причем уровень экспрессии FAK напрямую коррелируется с опухолями, имеющими наиболее агрессивный фенотип [Weiner TM, et al., *Lancet.* 342(8878):1024-1025, 1993; Owens et al., *Cancer Research.* 55:2752-2755, 1995; Maung K. et al., *Oncogene.* 18:6824-6828, 1999; Wang D et al., *J. Cell Sci.* 113:4221-4230, 2000].

#### KDR

KDR (Kinase insert Domain Receptor), называемая также VEGF-R2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, рецептор-2 фактора роста эндотелия сосудов), экспрессируется только в эндотелиальных клетках. Этот рецептор фиксируется на ангиогенном факторе роста VEGF и является, таким образом, медиатором передачи сигнала посредством активации собственного межклеточного киназного домена. Прямое ингибирование активности киназы VEGF-R2 позволяет уменьшить явление ангиогенеза в присутствии экзогенного VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor: фактор роста эндотелия сосудов) (Strawn et al., *Cancer Research*, 1996, vol. 56, p.3540-3545). Этот способ был выполнен, в частности, с помощью мутантов VEGF-R2 (Millauer et al., *Cancer Research*, 1996, vol.56, p.1615-1620). Рецептор VEGF-R2, по-видимому, не имеет какой-либо другой функции у взрослого человека, кроме функции, связанной с ангиогенной активностью VEGF. Следовательно, селективный ингибитор активности рецептора VEGF-R2 в отношении киназы, по-видимому, будет проявлять лишь незначительную токсичность.

Кроме этой главной роли в процессе динамического ангиогенеза согласно последним данным предполагается, что экспрессия VEGF способствует выживанию опухолевых клеток после химио- и рентгенотерапии, и подчеркивается потенциальный синергизм ингибиторов KDR с другими агентами (Lee et al., *Cancer Research*, 2000, vol.60, p.5565-5570).

#### Tie2

Tie2 (TEK) относится к семейству рецепторов тирозинкиназы, специфической к эндотелиальным клеткам. Tie2 является первым рецептором с активностью тирозинкиназы, о котором известно, что он одновременно является агонистом (ангиопэтин 1 или Ang1), который стимулирует аутофосфорилирование рецептора и клеточные сигнальные пути [S. Davis et al (1996) *Cell* 87, 1161-1169], и антагонистом (ангиопэтин 2 или Ang2) [P.C. Maisonpierre et al. (1997) *Science* 277, 55-60]. Ангиопэтин 1 может проявлять синергизм с VEGF на последних стадиях неопластического ангиогенеза [Asahara T. *Circ. Res.* (1998) 233-240]. В результате опытов с нокаутом и при использовании трансгенных манипуляций с экспрессией Tie2 или Ang1 появились животные, у которых наблюдается дефицит васкуляризации [D.J. Dumont et al., (1994) *Genes Dev.* 8, 1897-1909 et C. Suri (1996) *Cell* 87, 1171-1180]. Связь Ang1 со своим рецептором приводит к аутофосфорилированию домена киназы Tie2, которая играет существенную роль в неоваскуляризации, а также в привлечении клеток и взаимодействии сосудов с перичитами и клетками гладких мышц; эти явления способствуют созреванию и стабильности вновь сформовавшихся сосудов [P.C. Maisonpierre et al (1997) *Science* 277, 55-60]. Авторы Lin et al (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 8: 2072-2078 и Lin P. (1998) *PNAS* 95, 8829-8834, показали ингибирование роста и васкуляризации опухоли, а также уменьшение метастазирования в легких при аденовирусных инфекциях или при инъекциях внеклеточного домена Tie2 (Tek) на моделях ксенотрансплантации опухоли молочной железы и меланомы.

Ингибиторы Tie2 могут быть использованы в случаях, когда неоваскуляризация протекает с патологией (т.е. в случае диабетической ретинопатии, хронического воспаления, псориаза, саркомы Капоши, хронической неоваскуляризации, вызванной макулярной дегенерацией, ревматоидного артрита, инфан-

тильной гемоангиомы и злокачественных опухолей).

Развитие клеточного цикла часто регулируется циклин-зависимыми киназами (CDK), которые активируются в результате взаимодействия с белками, относящимися к семейству циклинов, эта активация заканчивается фосфорилированием субстратов и, в конце концов, делением клеток. Кроме этого, эндогенные ингибиторы активированных CDK-киназ (семейство INK4 и KIP/CIP) отрицательно регулируют активность CDK. Рост нормальных клеток связан с балансом между активаторами CDK (циклины) и эндогенными ингибиторами CDK. В литературе описана экспрессия или аномальная активность нескольких из этих регуляторов клеточного цикла на злокачественных опухолях различного типа.

Циклин E активирует киназу Cdk2, которая затем вызывает фосфорилирование белка pRb (белок ретинобластомы), приводящее в результате к началу необратимого деления клеток и переходу в фазу S (PL Toogood, Medicinal Research Reviews (2001), 21(6); 487-498). Киназа CDK2 и, возможно, киназа CDK3 необходимы для развития в фазе G1 и для входа в фазу S. Во время образования комплекса с циклином E киназы поддерживают гиперфосфорилирование pRb и помогают развитию фазы G1 в фазу S. В комплексах с циклином A киназа CDK2 играет определенную роль в инактивации E2F и является необходимой для осуществления фазы S (TD. Davies et al.(2001) Structure 9, 389-3).

Комплекс CDK1/циклин B регулирует развитие клеточного цикла между фазой G2 и фазой M. Отрицательная регуляция комплекса CDK/циклин B мешает нормальным клеткам войти в фазу S прежде, чем фаза G2 будет корректно и полностью завершена (K.K. Roy and E.A. Sausvillt Current Pharmaceutical Design, 2001, 7, 1669-1687).

Существует уровень регуляции активности CDK. Активаторы циклин-зависимых киназ (CAK) вызывают положительную регуляцию CDK. CAK фосфорилируют CDK по остатку треонина, превращая фермент в полностью активную мишень.

В связи с тем, что наличие дефектов в молекулах, воздействующих на клеточный цикл, влечет за собой активацию CDK и развитие цикла, то естественно желание ингибировать активность ферментов CDK для блокирования роста раковых клеток.

Многочисленные белки, участвующие в сегрегации хромосом и в сборке пучка, были идентифицированы в дрожжах и дрозофиле. Дезорганизация этих белков приводит к несегрегации хромосом и к монополярным или дезорганизованным пучкам. Среди этих белков некоторые киназы, в частности Aurora и Ip11, происходящие, соответственно, из дрозофил и *S.cerevisiae*, необходимы для сегрегации хромосом и выделения centrosомы. Человеческий аналог Ip11 дрожжей был в последнее время клонирован и охарактеризован в различных лабораториях. Эта киназа, названная Aurora2, STK15 или BTAК, принадлежит семейству серин/треониновых киназ. Авторы Bischoff et al. показали, что Aurora2 является онкогенной и амплифицируется в колоректальных злокачественных опухолях человека (EMBO J, 1998, 17, 3052-3065). Этот факт подтверждается на примерах злокачественных опухолей, происходящих от эпителиальных опухолей, таких как злокачественная опухоль молочной железы.

#### Характеристика терминов

Под термином «галоген» подразумевается элемент, выбираемый из F, Cl, Br и I.

Под термином «алкил» подразумевается углеводородный насыщенный заместитель, линейный или разветвленный, имеющий 1-12 атомов углерода. Примерами алкильного заместителя являются метил, этил, пропил, 1-метилэтил, бутил, 1-метилпропил, 2-метилпропил, 1,1-диметилэтил, пентил, 1-метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, гексил, 1-метилпентил, 2-метилпентил, 1-этилбутил, 2-этилбутил, 3,3-диметилбутил, гептил, 1-этилпентил, октил, нонил, децил, ундецил и додецил.

Под термином «алкилен» подразумевается углеводородный заместитель, линейный или разветвленный, имеющий одну или несколько ненасыщенных связей и содержащий 2-12 атомов углерода. Примерами алкиленового заместителя являются заместители этиленил, 1-метилэтиленил, проп-1-енил, проп-2-енил, Z-1-метилпроп-1-енил, E-1-метилпроп-1-енил, Z-1,2-диметилпроп-1-енил, E-1,2-диметилпроп-1-енил, бут-1,3-диенил, 1-метиленпроп-2-енил, Z-2-метилбут-1,3-диенил, E-2-метилбут-1,3-диенил, 2-метил-1-метиленпроп-2-енил, ундец-1-енил и ундец-10-енил.

Под термином «алкинил» подразумевается углеводородный заместитель, линейный или разветвленный, имеющий по меньшей мере две ненасыщенные связи, находящиеся между двумя соседними атомами углерода, и содержащий 2-12 атомов углерода. Примерами алкинилового заместителя являются заместители этинил, проп-1-инил, проп-2-инил и бут-1-инил.

Под термином «арил» подразумевается моно- или полициклический ароматический заместитель, имеющий 6-14 атомов углерода. Примерами арильного заместителя являются фенил, нафт-1-ил, нафт-2-ил, антрацен-9-ил, 1,2,3,4-тетрагидронафт-5-ил и 1,2,3,4-тетрагидронафт-6-ил.

Под термином «гетероарил» подразумевается моно- или полициклический гетероароматический заместитель, имеющий 1-13 атомов углерода и 1-4 гетероатома. Примерами гетероарильного заместителя являются пиррол-1-ил, пиррол-2-ил, пиррол-3-ил, фурил, тиенил, имидазолил, оксазолил, тиазолил, изоксазолил, изотиазолил, 1,2,4-триазазол, оксадиазолил, тиадиазолил, тетразолил, пиридил, пиримидил, пиазанил, 1,3,5-триазинил, индолил, бензо[b]фурил, бензо[b]тиенил, индазолил, бензимидазолил, азаиндолил, хинолил, изохинолил, карбазолил и акридил.

Под термином «гетероатом» подразумевается по меньшей мере один двухвалентный атом, отличающийся от атома углерода. Примерами гетероатома являются N, O, S и Se.

Под термином «циклоалкил» подразумевается циклический углеводородный заместитель, насыщенный или частично ненасыщенный, имеющий 3-12 атомов углерода. Примерами циклоалкильного заместителя являются заместители циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклопентадиенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, бицикло[2.2.1]гептил, циклооктил, бицикло[2.2.2]октил, адамантил и пергидронафтил.

Под термином «гетероциклический радикал» подразумевается циклический углеводородный заместитель, насыщенный или частично ненасыщенный, имеющий 1-13 атомов углерода и 1-4 гетероатома. Предпочтительно, циклическим углеводородным заместителем, насыщенным или частично ненасыщенным, является моноциклический углеводород, который содержит 4 или 5 атомов углерода и 1-3 гетероатома.

Под термином «замещенный» подразумевается один или несколько заместителей, отличающихся от H, например галоген, алкил, арил, гетероарил, циклоалкил, гетероциклический радикал, алкилен, алкинил, OH, O-алкил, O-алкилен, O-арил, O-гетероарил, NH<sub>2</sub>, NH-алкил, NH-арил, NH-гетероарил, N-алкил-алкил', SH, S-алкил, S-арил, S(O<sub>2</sub>)H, S(O<sub>2</sub>)-алкил, S(O<sub>2</sub>)-арил, SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub>-алкил, SO<sub>3</sub>-арил, CHO, C(O)-алкил, C(O)-арил, C(O)OH, C(O)O-алкил, C(O)O-арил, OC(O)-алкил, OC(O)-арил, C(O)NH<sub>2</sub>, C(O)NH-алкил, C(O)NH-арил, NHCHO, NHC(O)-алкил, NHC(O)-арил, NH-циклоалкил, NH-гетероциклический радикал.

Соединения согласно изобретению могут быть получены на основе методов классической органической химии. Приведенная ниже схема 1 иллюстрирует способ, использованный для получения соединения в примере 1, относящегося к замещенным 6-азаиндолам. Однако этот способ, приведенный в качестве примера, не является ограничением объема изобретения в части способов получения заявленных соединений.

Получение производных 6-азаиндол-2-карбоксамида, замещенных в положении 3:

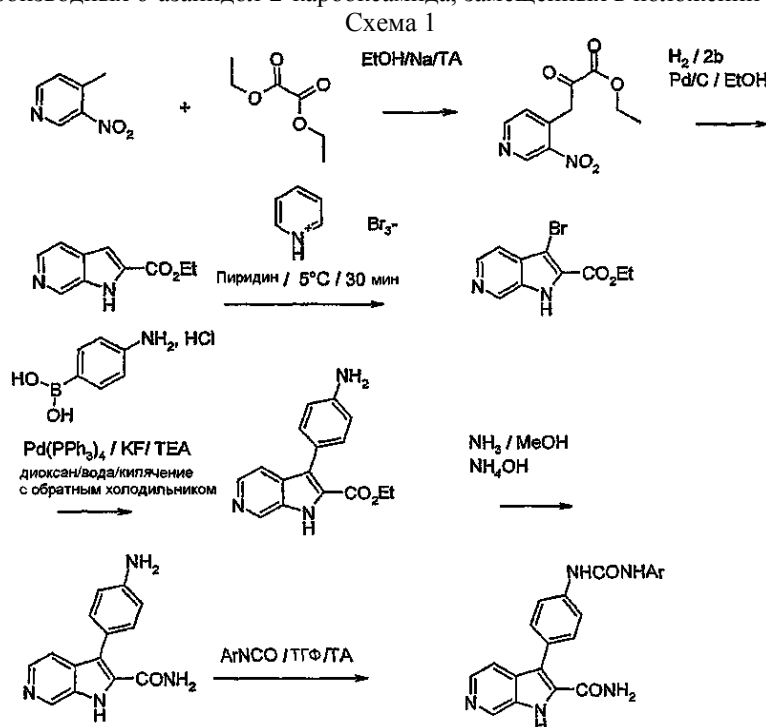
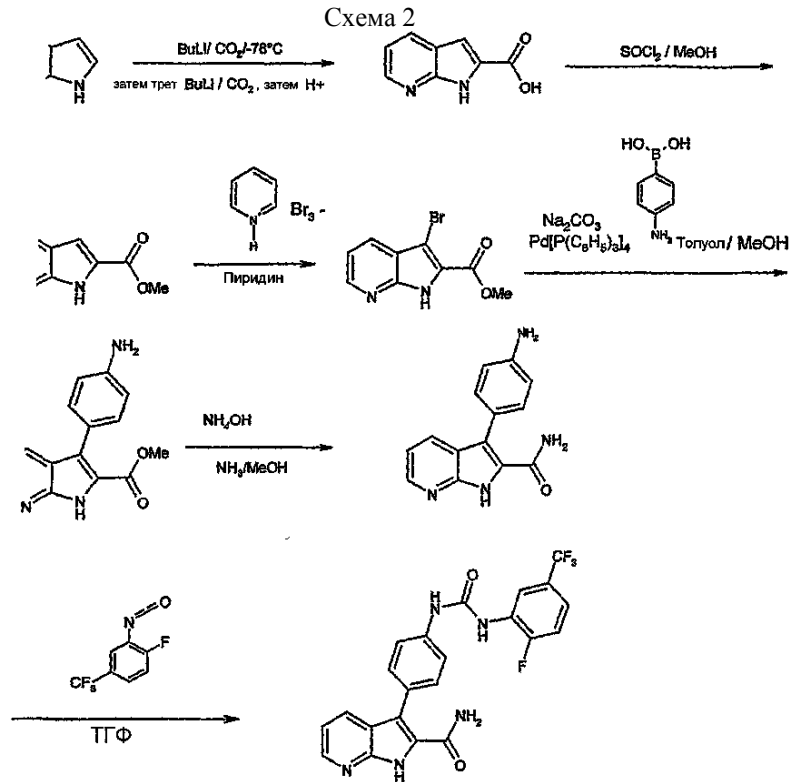


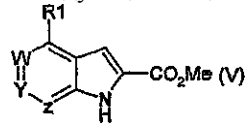
Схема 2, представленная ниже, иллюстрирует способ, использованный в примерах, относящихся к получению замещенных 7-азаиндолов, в частности, согласно примеру 7. Однако этот способ, приведенный в качестве примера, не ограничивает объем изобретения в части способов получения заявленных соединений.

Получение производных 7-азаиндол-2-карбоксамида, замещенных в положении 3:



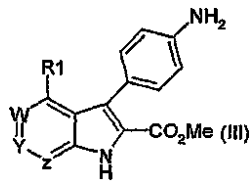
Соединения общей формулы (I), в которой Ra отличается от H, могут быть получены согласно традиционным способам, известным специалисту, заменяя аммиак для проведения аминолиза на соответствующий первичный алкиламин.

Настоящее изобретение относится также к способу получения соединений формулы (I), описанной выше, отличающемуся тем, что соединение следующей общей формулы (V):



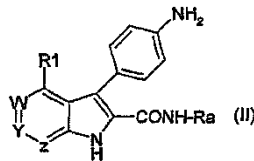
подвергают следующим операциям:

- a) галогенированию в положении 3, затем
- b) реакции сочетания Сузуки в положении 3 с получением соединения следующей общей формулы (III):



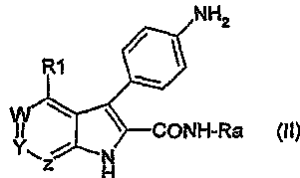
затем

- c) амидированию сложного эфира в положении 2 с получением соединения следующей общей формулы (II):



затем

- d) ацилированию аминофенильной группы в положении 3. Настоящее изобретение относится также к промежуточным соединениям, представляющим собой соединения общей формулы (II):



в которой Z, Y, W имеют указанные выше значения, для получения продуктов общей формулы (I).

Анализы, проведенные методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC/MS), осуществлены на приборе Micromass, модель LCT, соединенном с прибором HP 1100. Весь спектр продуктов анализировали с помощью детектора с диодной матрицей HP G1315A при длине волн в диапазоне 200-600 нм и детектора с устройством рассеяния света Sedex 65. Снятие масс-спектров осуществлялось в диапазоне волн 180-800 нм. Данные анализировались с использованием компьютерного программного обеспечения Micromass MassLynx. Разделение осуществлялось на колонке Hypersil BDS C18, 3 мкм (50×4,6 мм) при элюировании с линейным градиентом 5-90% ацетонитрила, содержащего 0,05% (об./об.) трифторуксусной кислоты (TFA) в воде, содержащей 0,05% (об./об.) TFA, в течение 3,5 мин с расходом 1 мл/мин. Общее время анализа, включая период повторного уравнивания колонки, составляло 7 мин.

Спектры MS получали путем электронного распыления (ES<sup>+</sup>) на приборе Platform II (Micromass). Были описаны основные наблюдаемые ионы.

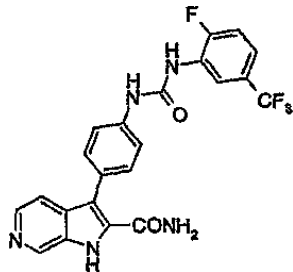
Температуры плавления определяли методом плавления в капилляре на аппарате Mettler FP62 в интервале температур 30-300°C при повышении температуры на 2°C в мин.

#### Очистка методом LC/MS

Продукты могут быть очищены методом LC/MS с использованием системы Waters FractionLynx, состоящей из градиентного насоса Waters, модель 600, обратного насоса Waters, модель 515, промывного насоса Waters Reagent Manager, автоматического инжектора Waters, модель 2700, двух вентилях Rheodyne, модель LabPro, детектора с диодной матрицей Waters, модель 996, масс-спектрометра Waters, модель ZMD и сборника фракций Gilson, модель 204. Система контролировалась с помощью программного обеспечения Waters FractionLynx. Разделение осуществлялось поочередно на двух колонках Waters Symmetry (C<sub>18</sub>, 5 мкм, 19×50 мм, номер по каталогу 186000210), причем одна колонка находилась в режиме регенерации смесью вода/ацетонитрил 95/5 (об./об.), содержащей 0,07% (об./об.) трифторуксусной кислоты, в то время как вторая колонка находилась в режиме разделения. Элюирование в колонках осуществлялось с линейным градиентом 5-95% ацетонитрила, содержащего 0,07% (об./об.) трифторуксусной кислоты (TFA) в воде, с расходом 10 мл/мин. На выходе из разделительной колонки одна тысячная часть эффлюента отделялась в жидкостном хроматографе Packing Accurate, разбавлялась метиловым спиртом с расходом 0,5 мл/мин и направлялась на детекторы из расчета: 75% на детектор с диодной матрицей, а остальные 25% направлялись на масс-спектрометр. Остаток эффлюента (999/1000) направляли в сборник фракций, из которого поток удалялся до тех пор, пока масса целевого продукта не будет определяться устройством с программным обеспечением FractionLynx. Вещества с формулой целевых продуктов поступали в устройство с программным обеспечением FractionLynx, которое включало сбор продукта, когда сигнал от определяемой массы соответствует иону [M+H]<sup>+</sup> и/или [M+Na]<sup>+</sup>. В некоторых случаях, в зависимости от результатов анализа LC/MS, когда интенсивный ион, соответствующий иону [M+2H]<sup>++</sup> был обнаружен, значение, соответствующее половине рассчитанной молекулярной массы (MW/2), также поступало на устройство с программным обеспечением FractionLynx. В этих условиях сбор также выполнялся, как только обнаруживался сигнал массы иона [M+2H]<sup>++</sup> и/или [M+Na+H]<sup>++</sup>. Продукты собирали в тарированную стеклянную трубку. После сбора растворители выпаривали в центрифужном испарителе Savant AES 2000 или Genevac HT8 и массы продуктов определяли взвешиванием трубок после испарения растворителей.

Другой объект изобретения относится к продуктам, полученным в изложенных ниже примерах, которые иллюстрируют настоящее изобретение, но не ограничивают его.

Пример 1. 3-{4-[3-(2-Фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



К раствору 90 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в 5 мл тетрагидрофурана добавляют по каплям 50 мкл 2-фтор-5-(трифторметил)фенилизотиоцианата. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток перемешивают в течение 30 мин в 2 мл дихлорметана. Суспензию твердого вещества фильтруют и центрифугируют. После сушки в вакууме при 40°C получают 115 мг 3-{4-[3-(2-фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид, который имеет следующие характеристики: ИК (KBr): 3455; 1661; 1602; 1542; 1444; 1341; 1312; 1127; 1070 и 819 см<sup>-1</sup>. ЯМР <sup>1</sup>H: 6,98 (ушир.с, 1H); 7,39 (ушир.м, 1H); 7,42-7,56 (м, 4H); 7,60 (ушир.д, J=8,0 Гц, 2H); 7,74 (ушир.с, 1H); 8,17 (д, J=6,0 Гц, 1H); 8,65 (ушир.д, J=7,5 Гц, 1H); 8,82 (с, 1H); 8,94 (ушир.с, 1H);

9,31 (с, 1H); 12,15 (ушир.с, 1H). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): m/z=458 [M+H]<sup>+</sup>. Температура плавления: 286°C (Кюфлер).

3-(4-Аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.

К раствору 600 мг этил-3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилата в 62 мл 3н. раствора аммиака в метаноле добавляют 11 мл 22%-го водного раствора гидроксида аммония. Реакционную смесь перемешивают в течение 20 ч в автоклаве при 80°C (12 бар), затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток разводят в 100 мл метанола, обрабатывают сажей и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. Смесь фильтруют в горячем состоянии на целите, затем промывают при помощи 2×10 мл метанола. Фильтрат концентрируют при пониженном давлении и получают 490 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде воздушной массы со следующими характеристиками: масс-спектр (EI) m/z=252 [M]<sup>+</sup>, m/z=235 [M-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>.

Этил-3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилат.

К раствору 1 г этил-3-бром-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилата в 100 мл диоксана добавляют 773 мг гидрохлорида 4-аминофенилбороновой кислоты и 1,1 г фторида калия в 9 мл воды. Реакционную смесь перемешивают в атмосфере аргона в течение 15 мин. Добавляют 425 мг тетраакис(трифенилфосфин)палладия(0) и 630 мкл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивают в течение 17 ч при кипячении с обратным холодильником. После обработки сажей и последующей фильтрации на целите фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Остаток очищают флэш-хроматографией на кремниевой колонке (60; 35-70 мкМ), элюируя смесью дихлорметана, метанола и ацетонитрила (90/5/5 об.). Получают 600 мг этил-3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилата со следующими характеристиками: масс-спектр (EI) m/z=281[M]<sup>+</sup>, m/z = 235[M-OEt]<sup>+</sup>.

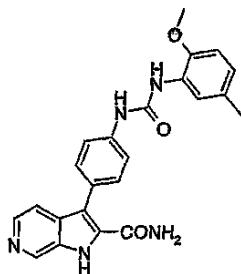
Этил-3-бром-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилат. К раствору 2,24 г этил-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилата в 150 мл пиридина добавляют по каплям раствор 3,53 г трибромида пиридиния в 30 мл пиридина при 5°C. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при температуре около 20°C, затем промывают с 500 мл ледяной воды. Суспензию фильтруют. Полученное твердое вещество промывают водой, затем сушат в сушильной камере в вакууме при 40°C. Получают 1,97 г этил-3-бром-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилата со следующими характеристиками: масс-спектр (EI) m/z=269[M]<sup>+</sup>, m/z = 189 [M-Br]<sup>+</sup>, m/z=144[M-OEt]<sup>+</sup>.

Этил-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилат. Загружают в автоклав 1,8 г 10%-го палладия на углеороде, затем пропускают поток инертного газа аргона. Добавляют раствор 6 г этил-3-(3-нитропиридин-4-ил)-2-оксопропионата в 72 мл абсолютного этанола. Реакционную смесь затем перемешивают 3 ч при 20°C при давлении водорода 2 бара. Затем смесь фильтруют на целите. Фильтрат концентрируют при пониженном давлении, сушат в сушильной камере в вакууме при 40°C и получают 4 г этил-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксилата со следующими характеристиками: масс-спектр (EI) m/z = 190 [M]<sup>+</sup>, m/z = 144[M-OEt]<sup>+</sup>.

Этил-3-(3-нитропиридин-4-ил)-2-оксопропионат.

К раствору 930 мг натрия в 50 мл абсолютного этанола быстро добавляют 26 мл диэтилоксалата. Реакционную смесь перемешивают 15 мин при 20°C. Добавляют по каплям в течение 1 ч раствор 3,8 г 4-метил-3-нитропиридина в 50 мл абсолютного этанола. Реакционную смесь перемешивают в течение 4 ч при температуре около 20°C, затем концентрируют при пониженном давлении. Остаток поглощают 100 мл этилового эфира и затем фильтруют. Твердое вещество перемешивают с 40 мл 5н. хлористоводородной кислоты, затем фильтруют, промывают водой, сушат в вакууме при 40°C и получают 6,2 г этил-3-(3-нитропиридин-4-ил)-2-оксопропионата со следующими характеристиками: масс-спектр (EI) m/z=238[M]<sup>+</sup>.

Пример 2. 3-{4-[3-(2-Метокси-5-метилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.

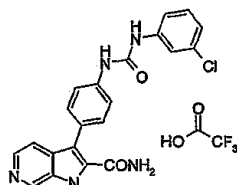


К раствору 100 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в 5 мл тетрагидрофурана добавляют по каплям 54,4 мкл 2-метокси-5-метилфенилизотиоцианата. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток перемешивают в течение 30 мин в 2 мл дихлорметана. Суспензию твердого вещества фильтруют, промывают водой и центрифугируют. После сушки в вакууме при 40°C получают 40 мг 3-{4-[3-(2-метокси-5-метилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид, который имеет следующие характеристики: ИК (KBr): 3458; 3331; 1664; 1595; 1537; 1315;



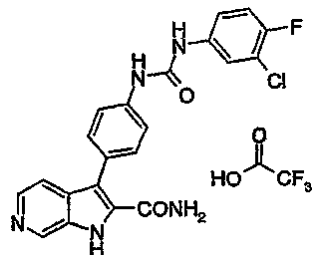
1285; 1213; 1135; 1033  $\text{cm}^{-1}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,24 (с, 3H); 3,86 (с, 3H); 6,75 (ушир.д,  $J=8,5$  Гц, 1H); 6,85-6,95 (м, 2H); 7,43 (ушир.д,  $J=8,5$  Гц, 2H); 7,46 (д,  $J=5,5$  Гц, 1H); 7,58 (ушир.д,  $J=8,5$  Гц, 2H); 7,73 (ушир.с, 1H); 8,02 (ушир.с, 1H); 8,16 (д,  $J=5,5$  Гц, 1H); 8,22 (с, 1H); 8,82 (с, 1H); 9,44 (ушир.с, 1H); 12,1 (ушир.с, 1H). Масс-спектр (EI):  $m/z=415$  [ $\text{M}^+$ ]. Температура плавления: 227°C.

Пример 3. Трифторацетат 3-{4-[3-(3-хлорфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



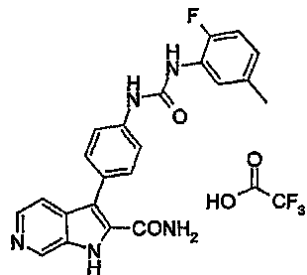
К раствору 100 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в 5 мл тетрагидрофурана добавляют по каплям 45,2 мкл 3-хлорфенилизоцианата. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток перемешивают в течение 30 мин в 2 мл дихлорметана. Суспензию твердого вещества фильтруют, промывают водой и центрифугируют. Окончательную очистку осуществляют путем препаративной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC/MS) и после сушки в вакууме при 40°C получают 70 мг 3-{4-[3-(3-хлорфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в форме трифторацетатной соли со следующими характеристиками: ИК (KBr): 3390; 1672; 1592; 1537; 1483; 1203; 1138; 836; 722  $\text{cm}^{-1}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 7,03 (м, 1H); 7,26-7,34 (м, 2H); 7,42-7,52 (м, 3H); 7,63 (ушир.д,  $J=8,5$  Гц, 2H); 7,74 (ушир.с, 1H); 7,97 (д,  $J=6,0$  Гц, 1H); 8,06 (ушир.с, 1H); 8,31 (д,  $J=6,0$  Гц, 1H); 9,03 (ушир.с, 2H); 9,13 (с, 1H); 13,35 (ушир.м, 1H). Масс-спектр ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z=406$  [ $\text{MH}^+$ ]. Температура плавления: 221°C.

Пример 4. Трифторацетат 3-{4-[3-(3-хлор-4-фторфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



К раствору 100 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в 5 мл тетрагидрофурана добавляют по каплям 46,2 мкл 3-хлор-4-фторфенилизоцианата. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток перемешивают в течение 30 мин в 2 мл дихлорметана. Суспензию твердого вещества фильтруют, промывают водой и центрифугируют. Окончательную очистку осуществляют методом препаративной LC/MS и после сушки в вакууме при 40°C получают 105 мг 3-{4-[3-(3-хлор-4-фторфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в форме трифторацетатной соли со следующими характеристиками: ИК (KBr): 3452; 1673; 1601; 1544; 1500; 1208; 1143; 836; 803; 722  $\text{cm}^{-1}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 7,32-7,38 (м, 2H); 7,44-7,54 (м, 3H); 7,64 (ушир.д,  $J=8,5$  Гц, 2H); 7,84 (ушир.д,  $J=7,5$  Гц, 1H); 8,01 (д,  $J=6,0$  Гц, 1H); 8,09 (ушир.с, 1H); 8,32 (д,  $J=6,0$  Гц, 1H); 9,10 (ушир.с, 2H); 9,16 (с, 1H); 13,4 (ушир.м, 1H). Масс-спектр ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z=424$  [ $\text{MH}^+$ ]. Температура плавления: 214°C.

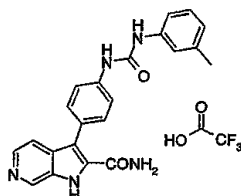
Пример 5. Трифторацетат 3-{4-[3-(2-фтор-5-метилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



К раствору 100 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в 5 мл тетрагидрофурана добавляют по каплям 48,3 мкл 2-фтор-5-метилфенилизоцианата. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток перемешивают в течение 30 мин в 2 мл дихлорметана. Суспензию твердого вещества фильтруют, промывают водой и центрифугируют. Окончательную очистку осуществляют методом препаративной LC/MS и после сушки в вакууме при 40°C получают 36 мг 3-{4-[3-(2-

фтор-5-метилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в форме трифторацетатной соли со следующими характеристиками: ИК (KBr): 3452; 1675; 1603; 1544; 1314; 1202; 1144; 836; 805; 722  $\text{см}^{-1}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,29 (с, 3H); 6,82 (м, 1H); 7,12 (дд, J=8,5 и 11,5 Гц, 1H); 7,46-7,51 (м, 3H); 7,62 (ушир.д, J=8,5 Гц, 2H); 7,97-8,03 (м, 2H); 8,08 (ушир.с, 1H); 8,32 (д, J=6,5 Гц, 1H); 8,54 (ушир.д, J=2,5 Гц, 1H); 9,15 (с, 1H); 9,25 (с, 1H); 13,4 (ушир.м, 1H). Масс-спектр ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z=404$  [ $\text{MH}^+$ ]. Температура плавления: 222°C.

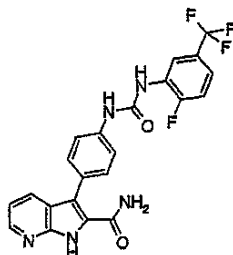
Пример 6. Трифторацетат 3-[4-(3-м-толилуреидо)фенил]-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



К раствору 100 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло [2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в 5 мл тетрагидрофурана добавляют по каплям 47,8 мкл м-толилизоцианата. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток перемешивают в течение 30 мин в 2 мл дихлорметана. Суспензию твердого вещества фильтруют, промывают водой и центрифугируют. Окончательную очистку осуществляют методом препаративной LC/MS и после сушки в вакууме при 40°C получают 40 мг 3-[4-(3-м-толилуреидо)фенил]-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в форме трифторацетатной соли со следующими характеристиками:

ИК (KBr): 3408; 1699; 1595; 1526; 1203; 1138; 834; 797; 724  $\text{см}^{-1}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,29 (с, 3H); 6,81 (ушир.д, J=7,5 Гц, 1H); 7,17 (т, J=7,5 Гц, 1H); 7,25 (ушир.д, J=7,5 Гц, 1H); 7,32 (ушир.с, 1H); 7,44 (ушир.с, 1H); 7,47 (ушир.д, J=8,5 Гц, 2H); 7,62 (ушир.д, J=8,5 Гц, 2H); 7,96 (ушир.м, 1H); 8,06 (ушир.с, 1H); 8,30 (д, J=6,0 Гц, 1H); 8,67 (с, 1H); 8,86 (с, 1H); 9,12 (с, 1H); 13,4 (ушир.м, 1H). Масс-спектр ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z=386$  [ $\text{MH}^+$ ].

Пример 7. 3-{4-[3-(2-Фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамида.



К раствору 130 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамида в 5 мл тетрагидрофурана добавляют по каплям 85 мкл 2-фтор-5-трифторметилфенилизотиоцианата. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток хроматографируют на кремниевой колонке (элюент: дихлорметан-метанол 9-1 об.). Фракции, содержащие целевое соединение, концентрируют при пониженном давлении. Получают 237 мг 3-{4-[3-(2-фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества белого цвета со следующими характеристиками. ИК (KBr): 1659; 1623; 1542; 1443; 1339; 1316; 1119  $\text{см}^{-1}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 7,08 (ушир.м, 1H); 7,14 (дд, J=5,0 и 8,0 Гц, 1H); 7,40 (м, 1H); 7,46 (ушир.д, J=8,5 Гц, 2H); 7,51 (м, 1H); 7,57 (ушир.д, J=8,5 Гц, 2H); 7,55-7,60 (м экранирован, 1H); 7,92 (ушир.д, J=8,0 Гц, 1H); 8,38 (ушир.д, J=5,0 Гц, 1H); 8,64 (ушир.д, J=7,5 Гц, 1H); 9,01 (ушир.с, 1H); 9,36 (ушир.с, 1H); 12,1 (ушир.с, 1H). Масс-спектр ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z=458$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]. Температура плавления: 232°C (Кофлер).

3-(4-Аминофенил)-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамида.

К раствору 260 мг метил-3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилата в 30 мл 7н. раствора аммиака в метаноле добавляют 5 мл 22%-го водного раствора гидроксида аммония. Реакционную смесь перемешивают в течение 20 ч в автоклаве при 80°C (12,6 бар), затем концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток хроматографируют на кремниевой колонке (элюент: дихлорметан-метанол 9-1 об.). Фракции, содержащие целевое соединение, концентрируют при пониженном давлении. Получают 140 мг 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества бледно-желтого цвета со следующими характеристиками.

Температура плавления: 139°C. Метил-3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилат.

К раствору 0,64 г метил-3-бром-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилата в 50 мл толуола и 50 мл метанола добавляют 1,08 г гидрохлорида 4-аминофенилбороновой кислоты и 0,9 мл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивают в атмосфере аргона в течение 15 мин. Последовательно добавляют 144 мг

тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0), 0,3 г хлорида лития, 0,66 г карбоната натрия и 7,5 мл дистиллированной воды. Реакционную смесь перемешивают в течение 8 ч при кипячении с обратным холодильником. После фильтрации на целите фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией на кремниевой колонке, элюируя смесью этилацетата и циклогексана (7-3 об.). Получают 400 мг метил-3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилата со следующими характеристиками. Температура плавления: 236°C.

Метил-3-бром-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилат.

К раствору 3,2 г гидрохлорида метил-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилата в 165 мл пиридина добавляют по каплям при 0°C в атмосфере аргона раствор 5,04 г трибромида пиридина в 35 мл пиридина. Реакционную смесь затем перемешивают при температуре 0°C, затем выливают в смесь 250 г колотого льда и 750 мл дистиллированной воды. Суспензию фильтруют, твердое вещество промывают 2 раза при помощи 25 мл дистиллированной воды, затем сушат на открытом воздухе. Получают 0,87 г метил-3-бром-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилата в виде твердого вещества бежевого цвета со следующими характеристиками. Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): m/z = 256 [M+H<sup>+</sup>].

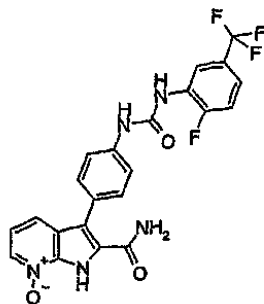
Гидрохлорид метил-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилата.

К раствору 4 г гидрохлорида 1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоновой кислоты в 100 мл метанола добавляют по каплям при комнатной температуре 6 мл тионилхлорида. Реакционную смесь затем перемешивают в течение 5 ч при комнатной температуре и концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток растирают в 50 мл этилового эфира, затем сушат в вакууме при 40°C. Получают 3,22 г гидрохлорида метил-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксилата в виде твердого вещества бледно-желтого цвета, используемого без очистки на следующей стадии.

Гидрохлорид 1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоновой кислоты.

К раствору, охлажденному до -70°C, 6,03 г 1Н-пирроло[2,3-б]пиридина в 75 мл безводного ТГФ добавляют по каплям 33 мл 1,6М раствора н-бутиллития в гексане. После перемешивания при -70°C в течение 15 мин добавляют к раствору 20 г кусочков сухого льда. Доводят температуру раствора до комнатной и затем концентрируют при пониженном давлении. Получают 8,4 г твердого вещества белого цвета, которое растворяют в 175 мл тетрагидрофурана. Этот раствор охлаждают до -70°C, затем прикапывают 35 мл 1,5М раствора трет-бутиллития в гексане. После 30 мин перемешивания при -70°C добавляют в раствор 20 г кусочков сухого льда. Доводят температуру раствора до комнатной и затем выливают эту реакционную смесь в 50 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Тетрагидрофуран выпаривают при пониженном давлении. Остаток водного раствора разбавляют в 150 мл дистиллированной воды, промывают два раза при помощи 100 мл дихлорметана, подкисляют до pH 1 добавлением 30 мл 5н. водного раствора хлористо-водородной кислоты, затем концентрируют при пониженном давлении. Получают 10,01 г пастообразного продукта, который перекристаллизовывают из 50 мл метанола. Полученный твердый продукт обрабатывают смесью 50 мл 7н. хлористо-водородного раствора изопропанола и 50 мл изопропилового эфира. После сушки на открытом воздухе получают 5,71 г гидрохлорида 1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоновой кислоты в виде твердого вещества кремового цвета. Масс-спектр (EI) : m/z = 162 [M<sup>+</sup>].

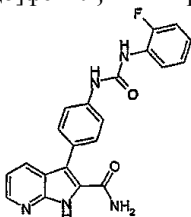
Пример 8. 3-{4-[3-(2-Фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-7-окси-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



К раствору, находящемуся при температуре 0°C, 50 мг 3-{4-[3-(2-фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в 2 мл хлороформа добавляют по каплям 0,31 мл 0,7М раствора метахлорпербензойной кислоты в хлороформе. Раствор перемешивают при 0°C в течение 4 ч, затем в течение 16 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляют при помощи 3 мл дихлорметана, фильтруют через фриттированное стекло № 4, полученное твердое вещество промывают дважды 3 мл дихлорметана, затем сушат на воздухе. Получают 40 мг 3-{4-[3-(2-фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-7-окси-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета со следующими характеристиками: ИК (KBr): 3352; 1671; 1609; 1545; 1442; 1340; 1315; 1239; 1119; 1069 и 885 см<sup>-1</sup>. ЯМР <sup>1</sup>H: 7,16 (м, 1H); 7,35-7,58 (м, 7H); 7,63 (ушир.м, 1H); 7,77 (ушир.м, 1H); 8,31 (ушир.д, J=6,0 Гц, 1H); 8,65 (ушир.д, J=8,5 Гц, 1H); 8,94 (ушир.с, 1H); 9,29 (с, 1H); 12,5-13,2 (очень ушир.м, 1H). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>) : m/z=474 [M+H<sup>+</sup>]. Температура плавления: 220°C (Коф-

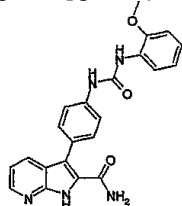
лер).

Пример 9. 3-{4-[3-(2-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



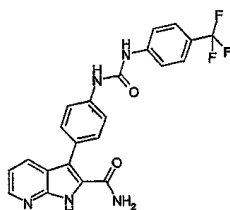
66,6 мг 3-{4-[3-(2-фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 2-фторфенилизотиоцианата. Температура плавления = 268,7°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=390. Время удерживания (мин): 3,71.

Пример 10. 3-{4-[3-(2-Метоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



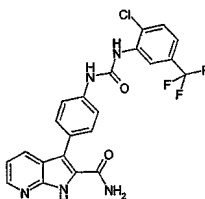
83,6 мг 3-{4-[3-(2-метоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 2-метоксифенилизотиоцианата. Температура плавления = 227,1°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=402. Время удерживания (мин): 3,77.

Пример 11. 3-{4-[3-(4-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



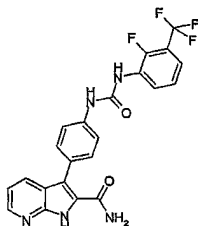
77,6 мг 3-{4-[3-(4-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 4-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления = 296,2°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=440. Время удерживания (мин): 4,24.

Пример 12. 3-{4-[3-(2-Хлор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



40,56 мг 3-{4-[3-(2-Хлор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 2-хлор-5-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления = 188,3°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=474. Время удерживания (мин): 4,51.

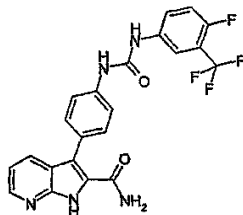
Пример 13. 3-{4-[3-(2-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



79 мг 3-{4-[3-(2-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбо-

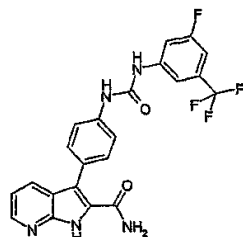
ксамида в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 2-хлор-3-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления = 265,4°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=458. Время удерживания (мин): 4,24.

Пример 14. 3-{4-[3-(4-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



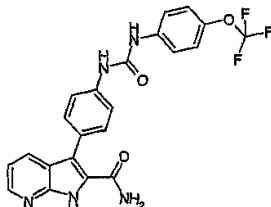
76,5 мг 3-{4-[3-(4-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества коричневого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 4-фтор-3-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления = 234,7°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=458. Время удерживания (мин): 4,22.

Пример 15. 3-{4-[3-(3-Фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



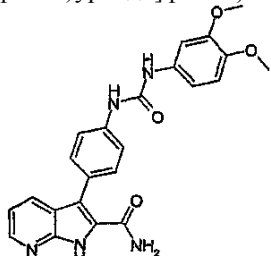
78,1 мг 3-{4-[3-(3-Фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3-фтор-5-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления = 257,5°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=458. Время удерживания (мин): 4,42.

Пример 16. 3-{4-[3-(4-Трифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



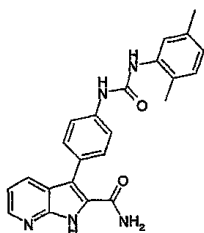
92,3 мг 3-{4-[3-(4-Трифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде порошка каштанового цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 4-трифторметоксифенилизотиоцианата. Температура плавления = 258,9°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=456. Время удерживания (мин): 4,29.

Пример 17. 3-{4-[3-(3,4-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид



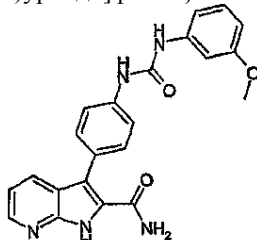
79 мг 3-{4-[3-(3,4-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3,4-диметоксифенилизотиоцианата. Температура плавления = 223,7°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=432. Время удерживания (мин): 3,27.

Пример 18. 3-{4-[3-(2,5-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



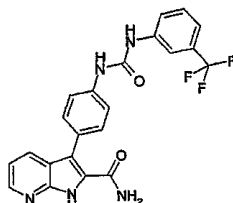
75,9 мг 3-{4-[3-(2,5-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 2,5-диметилфенилизоцианата. Температура плавления = 308,8°C (Бюхи). Масс-спектр ( $ES^+$ ):  $[M+H]^+=400$ . Время удерживания (мин): 3,90.

Пример 19. 3-{4-[3-(3-Метоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



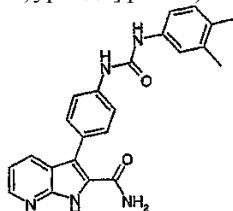
55,5 мг 3-{4-[3-(3-Метоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3-метоксифенилизоцианата. Температура плавления = 306,2°C (Бюхи). Масс-спектр ( $ES^+$ ):  $[M+H]^+=402$ . Время удерживания (мин): 3,39.

Пример 20. 3-{4-[3-(3-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



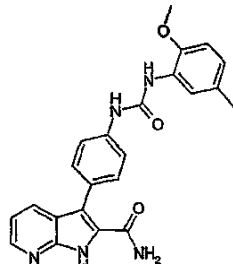
56,5 мг 3-{4-[3-(3-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления = 263,6°C (Бюхи). Масс-спектр ( $ES^+$ ):  $[M+H]^+=440$ . Время удерживания (мин): 3,95.

Пример 21. 3-{4-[3-(3,4-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



45,2 мг 3-{4-[3-(3,4-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3,4-диметилфенилизоцианата. Температура плавления = 274,7°C (Бюхи). Масс-спектр ( $ES^+$ ):  $[M+H]^+=400$ . Время удерживания (мин): 3,75.

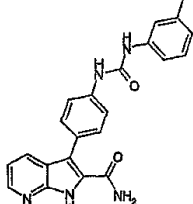
Пример 22. 3-{4-[3-(2-Метокси-5-метилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



44,9 мг 3-{4-[3-(2-Метокси-5-метилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исхо-

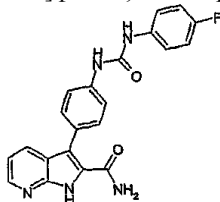
для из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 2-метокси-5-метилфенилизотиоцианата. Температура плавления = 327,7°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>) : [M+H]<sup>+</sup>=416. Время удерживания (мин): 3,76.

Пример 23. 3-[4-(3-м-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



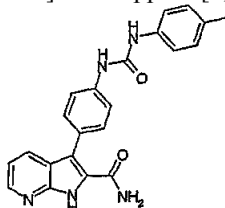
62,5 мг 3-[4-(3-м-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и м-толилизотиоцианата. Температура плавления = 266°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=386. Время удерживания (мин): 3,60.

Пример 24. 3-[4-[3-(4-Фторфенил)уреидо]фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



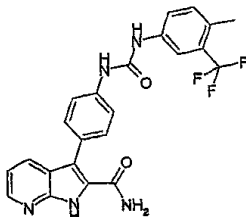
49,7 мг 3-[4-[3-(4-Фторфенил)уреидо]фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 4-фторфенилизотиоцианата. Температура плавления = 299,9°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>) : [M+H]<sup>+</sup>=390. Время удерживания (мин): 3,45.

Пример 25. 3-[4-(3-п-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



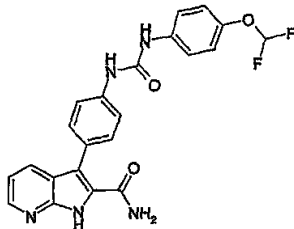
68,4 мг 3-[4-(3-п-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и п-толилизотиоцианата. Температура плавления = 293°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>) : [M+H]<sup>+</sup>=386. Время удерживания (мин): 3,58.

Пример 26. 3-[4-[3-(4-Метил-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



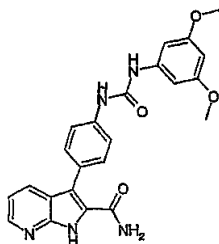
47,1 мг 3-[4-[3-(4-Метил-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 4-метил-3-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления = 285°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=454. Время удерживания (мин): 4,10.

Пример 27. 3-[4-[3-(4-Дифторметоксифенил)уреидо]фенил]-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



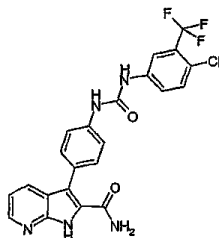
47,5 мг 3-{4-[3-(4-Дифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 4-дифторметоксифенилизоцианата. Температура плавления = 283,5°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=438. Время удерживания (мин): 3,64.

Пример 28. 3-{4-[3-(3,5-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



59,2 мг 3-{4-[3-(3,5-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3,5-диметоксифенилизоцианата. Температура плавления = 266,5°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=432. Время удерживания (мин): 3,45.

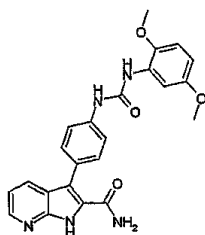
Пример 29. 3-{4-[3-(4-Хлор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



29,8 мг 3-{4-[3-(4-Хлор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 4-хлор-3-трифторметилфенилизоцианата.

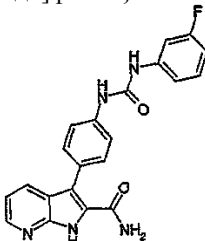
Температура плавления = 311,1°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=474. Время удерживания (мин): 4,22.

Пример 30. 3-{4-[3-(2,5-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



33,1 мг 3-{4-[3-(2,5-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде лиофилизата желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 2,5-диметоксифенилизоцианата. Масс-спектр: LC-MS-DAD-ELSD: 432(+)=(M+H)(+), 430(-)=(M-H)(-). Время удерживания (мин): 3,53.

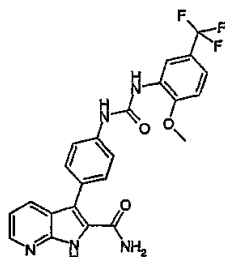
Пример 31. 3-{4-[3-(3-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



31,5 мг 3-{4-[3-(3-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде лиофилизата белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3-фторфенилизоцианата. Масс-спектр: LC-MS-DAD-ELSD: 390(+)=(M+H)(+), 388(-)=(M-H)(-). Время удерживания (мин): 3,55.

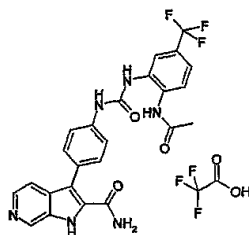
Пример 32. 3-{4-[3-(2-Метокси-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.





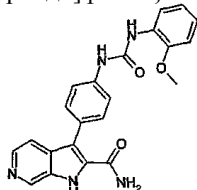
50 мг 3-{4-[3-(2-Метокси-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бежевого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-2-карбоксамид и 2-метокси-5-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления: 221°C (Кюфлер, с сублимацией). Масс-спектр: LC-MS-DAD-ELSD: 470(+)=(M+H)(+), 468(-)=(M-H)(-).

Пример 33. Трифторацетат 3-{4-[3-(2-ацетиламино-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



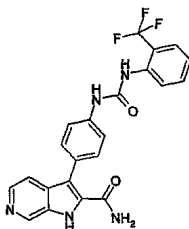
12 мг Трифторацетата 3-{4-[3-(2-ацетиламино-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 2-ацетиламино-5-трифторметилфенилизоцианата. Масс-спектр (ES<sup>+</sup>):[M+H]<sup>+</sup>=497. Время удерживания (мин): 2,63.

Пример 34. 3-{4-[3-(2-Метоксифенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



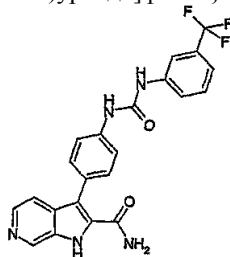
25 мг 3-{4-[3-(2-Метоксифенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 2-метоксифенилизоцианата. Температура плавления: 216°C (Кюфлер). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>):[M+H]<sup>+</sup>=402. Время удерживания (мин): 3,06.

Пример 35. 3-{4-[3-(2-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



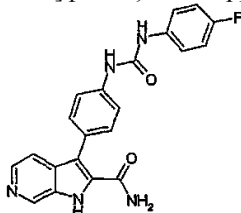
80 мг 3-{4-[3-(2-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 2-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления: 228°C (Кюфлер). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=440. Время удерживания (мин): 3,17.

Пример 36. 3-{4-[3-(3-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1H-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



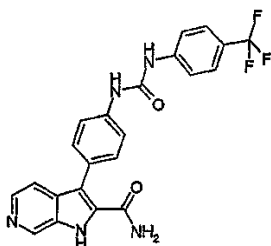
77 мг 3-{4-[3-(3-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 3-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления: 256°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=440. Время удерживания (мин): 3,48.

Пример 37. 3-{4-[3-(4-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



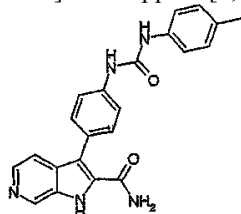
73 мг 3-{4-[3-(4-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 4-фторфенилизоцианата. Температура плавления: 271°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=390. Время удерживания (мин): 2,93.

Пример 38. 3-{4-[3-(4-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



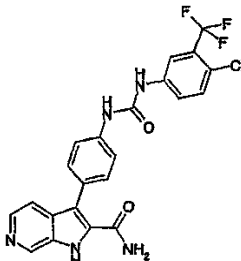
91 мг 3-{4-[3-(4-Трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 4-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления: 289°C. Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=440. Время удерживания (мин): 3,48.

Пример 39. 3-[4-(3-п-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



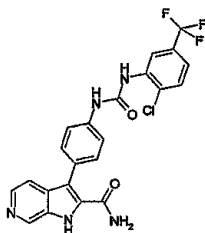
76 мг 3-[4-(3-п-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и п-толилизоцианата. Температура плавления: 277°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=386. Время удерживания (мин): 3,13.

Пример 40. 3-{4-[3-(4-Хлор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



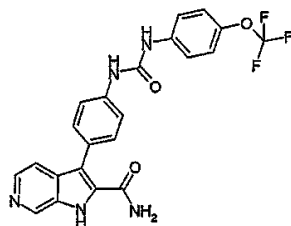
103 мг 3-{4-[3-(4-Хлор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 4-хлор-3-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления: 228°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=474. Время удерживания (мин): 3,64.

Пример 41. 3-{4-[3-(2-Хлор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



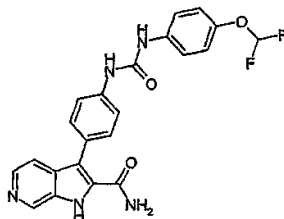
76 мг 3-{4-[3-(2-Хлор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 2-хлор-5-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления: 243°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=474. Время удерживания (мин): 3,56.

Пример 42. 3-{4-[3-(4-Трифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



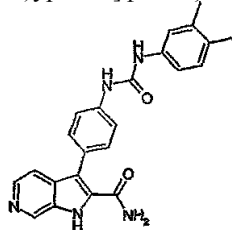
94 мг 3-{4-[3-(4-Трифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 4-трифторметоксифенилизоцианата. Температура плавления: 276°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=456. Время удерживания (мин): 3,63.

Пример 43. 3-{4-[3-(4-Дифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



87 мг 3-{4-[3-(4-Дифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 4-дифторметоксифенилизоцианата. Температура плавления: 257°C. Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=438. Время удерживания (мин): 3,23.

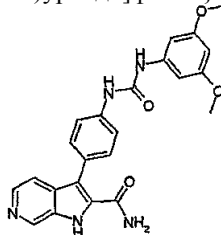
Пример 44. 3-{4-[3-(3,4-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



82 мг 3-{4-[3-(3,4-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида и 3,4-диметилфенилизоцианата.

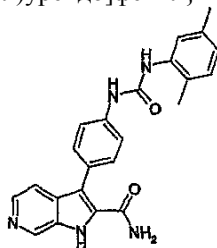
Температура плавления: 230°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=400. Время удерживания (мин): 3,32.

Пример 45. 3-{4-[3-(3,5-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамида.



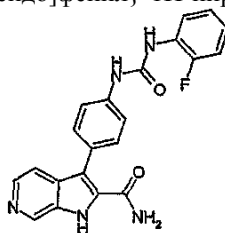
87 мг 3-{4-[3-(3,5-Диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3,5-диметоксифенилизоцианата. Температура плавления: 225°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=432. Время удерживания (мин): 3,07.

Пример 46. 3-{4-[3-(2,5-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



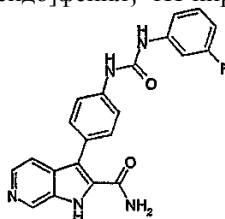
87 мг 3-{4-[3-(2,5-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 2,5-диметилфенилизоцианата. Температура плавления: 261°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=400. Время удерживания (мин): 3,25.

Пример 47. 3-{4-[3-(2-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



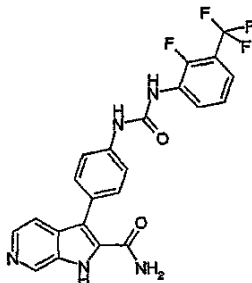
59 мг 3-{4-[3-(2-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 2-фторфенилизоцианата. Температура плавления: 242°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=390. Время удерживания (мин): 2,41.

Пример 48. 3-{4-[3-(3-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



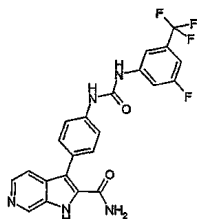
63 мг 3-{4-[3-(3-Фторфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3-фторфенилизоцианата. Температура плавления: 252°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=390. Время удерживания (мин): 2,55.

Пример 49. 3-{4-[3-(2-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



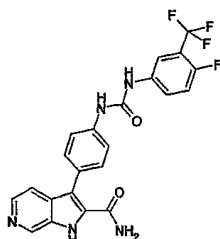
69 мг 3-{4-[3-(2-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 2-фтор-3-трифторметилфенилизоцианата. Температура плавления: 240°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=458. Время удерживания (мин): 2,75.

Пример 50. 3-{4-[3-(3-Фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



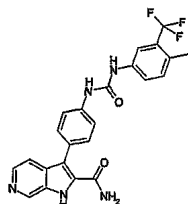
69 мг 3-{4-[3-(3-Фтор-5-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло [2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3-фтор-5-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления: 261°С (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=458. Время удерживания (мин): 2,88.

Пример 51. 3-{4-[3-(4-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



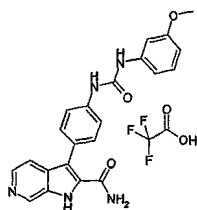
56 мг 3-{4-[3-(4-Фтор-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 4-фтор-3-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления: 201°С (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=458. Время удерживания (мин): 2,85.

Пример 52. 3-{4-[3-(4-Метил-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



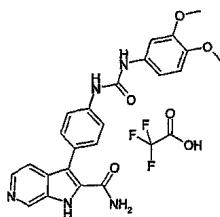
61 мг 3-{4-[3-(4-Метил-3-трифторметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 4-метил-3-трифторметилфенилизотиоцианата. Температура плавления: 199°С Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=454. Время удерживания (мин): 2,84.

Пример 53. Трифторацетат 3-{4-[3-(3-метоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



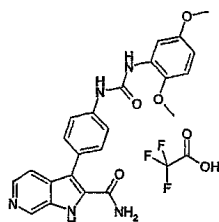
33,3 мг Трифторацетата 3-{4-[3-(3-метоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде лиофилизата желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3-метоксифенилизотиоцианата. Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=402. Время удерживания (мин): 2,60.

Пример 54. Трифторацетат 3-{4-[3-(3,4-диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



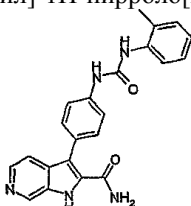
80,5 мг Трифторацетата 3-{4-[3-(3,4-диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде лиофилизата желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3,4-диметоксифенилизоцианата. Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=432. Время удерживания (мин): 2,27.

Пример 55. Трифторацетат 3-{4-[3-(2,5-диметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



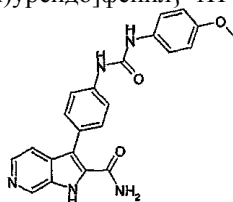
90,7 мг Трифторацетата 3-(4-[3-(2,5-диметоксифенил)уреидо]фенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде лиофилизата желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 2,5-диметоксифенилизоцианата. Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=432. Время удерживания (мин): 2,62.

Пример 56. 3-[4-(3-о-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



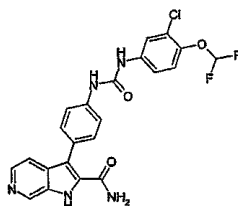
75,3 мг 3-[4-(3-о-Толилуреидо)фенил]-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и о-толилизотиоцианата. Температура плавления: 270°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=386. Время удерживания (мин): 2,54.

Пример 57. 3-[4-[3-(4-Метоксифенил)уреидо]фенил]-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



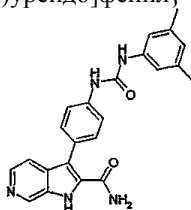
51,1 мг 3-{4-[3-(4-Метоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 4-метоксифенилизоцианата. Температура плавления: 275°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=402. Время удерживания (мин): 2,28.

Пример 58. 3-{4-[3-(3-Хлор-4-дифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



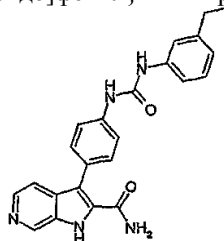
93 мг 3-{4-[3-(3-Хлор-4-дифторметоксифенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3-хлор-4-дифторметоксифенилизоцианата. Температура плавления: 267°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=472. Время удерживания (мин): 2,90.

Пример 59. 3-[4-[3-(3,5-Диметилфенил)уреидо]фенил]-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



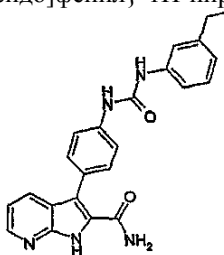
61 мг 3-{4-[3-(3,5-Диметилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3,5-диметилфенилизоцианата. Температура плавления: 188°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=400. Время удерживания (мин): 2,68.

Пример 60. 3-{4-[3-(3-Этилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид.



61 мг 3-{4-[3-(3-Этилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества бледно-желтого цвета получают согласно способу, описанному в примере 1, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-с]пиридин-2-карбоксамид и 3-этилфенилизоцианата. Температура плавления: 257°C (Бюхи В-545). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=400. Время удерживания (мин): 2,97.

Пример 61. 3-{4-[3-(3-Этилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид.



0,8 мг 3-{4-[3-(3-Этилфенил)уреидо]фенил}-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид в виде твердого вещества белого цвета получают согласно способу, описанному в примере 7, исходя из 3-(4-аминофенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-2-карбоксамид и 3-метилфенилизоцианата. Температура плавления: 254°C (Бюхи). Масс-спектр (ES<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>=400. Время удерживания (мин): 7,18.

#### Определение активности соединений

Описание методик проведения экспериментов.

##### 1. FAK.

Ингибирующую активность соединений в отношении фермента FAK определяли путем измерения ингибирования аутофосфорилирования фермента с использованием теста флуоресценции с разрешением во времени (HTRF).

Полную кДНК фермента FAK человека, N-конец которой мечен гистидином, клонировали в вектор экспрессии бакуловируса rFastBac. Белок экспрессировали и очищали до достижения гомогенности около 70%.

Активность киназы определяли путем инкубирования фермента (6,6 мкг/мл) с различными концентрациями исследуемого соединения в буфере, содержащем 50 мМ Hepes, pH 7,0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мкМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 15 мкМ АТФ, в течение 1 ч при 37°C. Реакцию ферментации останавливали добавкой буфера Hepes pH 7,0, содержащего 0,4 мМ KF, 133 мМ EDTA, 0,1% BSA, и осуществляли мечение в течение 1-2 ч при комнатной температуре путем добавления в этот буфер антител против гистидина, меченного XL665, и моноклональных антител, специфичных в отношении фосфорилированного тирозина, конъюгированного с криптоном европия (Eu-K). Характеристики двух флуорофоров можно найти в документе G.Mathis et al., *Anticancer Research*, 1997, 17, pp 3011-3014. Перенос энергии от возбужденного криптона европия к XL665-акцептору пропорционален степени аутофосфорилирования FAK. Продолжительность сигнала, специфичного в отношении XL665, измеряли в счетчике для считывания планшет Packard Discovery. Все опыты проводили в двух параллельных пробах и рассчитывали среднее значение по двум результатам. Ингибирующую активность в отношении аутофосфорилирования FAK соединений согласно изобретению выражали в процентах ингибирования по отношению к контрольному опыту, активность в котором измерялась в отсутствие тестируемого соединения. При подсчете % ингибирования учитывалось отношение: сигнал при 665 нм/сигнал при 620 нм.

##### 2. KDR.

Ингибирующее действие соединений определяли в тесте фосфорилирования субстрата ферментом KDR *in vitro* с использованием сцинтилляционного метода (96-луночный планшет, NEN).

Цитоплазмический домен фермента KDR человека клонировали в форме слитого GST в вектор экспрессии бакуловируса rFastBac. Белок экспрессировали в клетках SF21 и очищали до достижения гомогенности около 60%.

Активность киназы KDR измеряли в буфере, содержащем 20 мМ MOPS, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MnCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 2,5 мМ EGTA, 10 мМ б-глицерофосфата, pH 7,2, в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100

мкМ  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ , 1 мМ NaF. Добавляли 10 мкл соединения к 70 мкл киназного буфера, содержащего 100 нг фермента KDR, при температуре 4°C. Реакцию начинали добавлением 20 мкл раствора, содержащего 2 мкг субстрата (фрагмент SH2-SH3, полученный от PLC $\gamma$ , экспрессируемого в форме слитого белка GST), 2 мкКи  $\gamma^{33}\text{P}$ [ATP] и 2 мкМ холодного ATP. После 1 ч инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 1 объема (100 мкл) 200 мМ EDTA. Инкубационный буфер удаляли и лунки трижды промывали с помощью 300 мкл PBS. Радиоактивность подсчитывали в каждой лунке с использованием счетчика радиоактивности Top Count NXT (Packard).

Фоновый шум определяли измерением радиоактивности в четырех разных лунках, содержащих радиоактивный ATP, и одного субстрата.

Общую контрольную активность измеряли в четырех разных лунках, содержащих все реактивы ( $\gamma^{33}\text{P}$ -[ATP], KDR и субстрат PLC $\gamma$ ), но в отсутствие соединения. Ингибирующая активность соединения согласно изобретению в отношении KDR выражали в процентах ингибирования от контрольной активности, которая определялась в отсутствие соединения. Соединение SU5614 (Calbiochem) (1 мкМ) включается в каждый планшет в качестве контрольного ингибитора.

### 3. Tie2.

Кодирующая последовательность Tie2 человека, соответствующая аминокислотам 776-1124 межклеточного домена, генерировалась при помощи PCR с использованием кДНК, выделенной из человеческой плаценты, в качестве модели. Эту последовательность встраивали в вектор экспрессии бакуловируса rFastBacGT в форме слитого белка GST.

Эффект ингибирования, производимый молекулами, оценивали в тесте фосфорилирования PLC киназой Tie2 в присутствии комплекса GST-Tie2, очищенного, приблизительно, до достижения 80% гомогенности. Субстрат состоял из фрагментов SH2-SH3, полученных от PLC, экспрессируемого в форме слитого GST.

Активность киназы Tie2 измерялась в буфере, содержащем 20 мМ MOPS, pH 7,2, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 1 мМ DTT, 10 мМ глицерофосфата. На 96-луночный планшет FlashPlate, помещенный на лед, наносили реакционную смесь, состоящую из 70 мкл киназного буфера, содержащего 100 нг фермента GST-Tie2 в каждой лунке. Затем добавляли 10 мкл исследуемого соединения, разведенного с помощью ДМСО до максимальной концентрации 10%. Для заданной концентрации каждый замер проводился четыре раза. Реакцию инициировали добавлением 20 мкл раствора, содержащего 2 мкг GST-PLC, 2 мкМ холодного ATP и 1 мкКи  $^{33}\text{P}$ [ATP]. После 1 ч инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 1 объема (100 мкл) EDTA с концентрацией 200 мМ. После удаления инкубационного буфера лунки промывали три раза с помощью 300 мкл PBS. Радиоактивность измеряли на приборе MicroBeta 1450 Wallac.

Рассчитывали ингибирующую активность Tie2 и выражали ее в процентах ингибирования по отношению к контрольной активности, измеренной в отсутствие соединения.

### 4. Aurora 1 и Aurora 2.

Ингибирующий эффект соединений в отношении киназ Aurora 1 и Aurora 2 определяли с помощью ферментативного теста с использованием измерения радиоактивности.

Активность киназ Aurora 1 и Aurora 2 определялась путем фосфорилирования субстрата Numagистидин в присутствии ATP, меченного радиоактивной меткой ( $^{33}\text{P}$ ATP), и использования 96-луночных планшетов Flashplate, в которых никельсодержащий хелатный комплекс фиксирован на поверхности микропланшета. Количество фосфата  $^{33}\text{P}$ , введенного в субстрат NuMa, пропорционально активности фермента Aurora 1 или Aurora 2.

#### Белки.

Белки получены в лаборатории Sanofi-Aventis по получению белков.

Aurora 1: рекомбинантный комплекс Aurora-B/INCENP-C3, очищенный приблизительно до 50%, в котором N-концевой участок в Aurora-B мечен гистидином.

Aurora 2: цельный рекомбинантный белок, содержащий гистидиновый хвост на N-концевом участке, экспрессированный в *E.coli* и очищенный более, чем на 82%.

NuMa (ядерный белок, ассоциированный с митотическим аппаратом): фрагмент из 424 аминокислот, экспрессируемый в *E.coli*, N-концевой участок которого мечен гистидином и использован в качестве субстрата для двух ферментов Aurora.

#### Протокол.

Используемые микропланшеты представляли собой 96-луночные планшеты Flash-Plate с никельсодержащим хелатным комплексом (Perkin Elmer, модель SMP107).

Исследуемые продукты инкубировали при 37°C в реакционном объеме 100 мкл на лунку в присутствии 10 нМ Aurora 1 или Aurora 2, 500 нМ субстрата NuMa в буфере, состоящем из 50 мМ Tris/HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  (Aurora-B) или 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  (Aurora-A) и 1 мМ DTT.

В каждую лунку помещали 80 мкл инкубационного буфера фермент/субстрат, затем помещали 10 мкл исследуемого продукта с изменяющимися концентрациями. Реакцию инициировали добавлением 1 мкМ итогового ATP, содержащего 0,2 мкКи  $^{33}\text{P}$ [ATP] (10 мкл). После 30 мин инкубации реакцию останавливали простым удалением реакционного буфера и каждую лунку дважды промывали с 300 мкл бу-



фера Tris/HCl. Радиоактивность подсчитывали в каждой лунке с помощью сцинтилляционного прибора модели Packard, Top Count.

Ферментативная контрольная активность Аурога выражена в числе импульсов в минуту, полученных за 30 мин, после вычитания фонового шума (реакционная смесь, не содержащая фермента). Оценку разных исследуемых соединений выражали в процентах ингибирования активности Аурога по отношению к контролю.

#### 5. CDK2/циклин Е.

Очистка комплекса CDK2/циклин Е-(His)<sub>6</sub> методом ИМАС (Immobilized Metal Affinity Chromatography).

Два рекомбинантных бакуловируса, несущих человеческие последовательности, кодирующие, соответственно, CDK2 и Циклин Е (последний содержит гекса-гистидиновую метку на С-конце), использованы для ко-инфицирования клеток насекомого Sf21. Два-три дня спустя после начала ко-инфицирования клетки отделяли центрифугированием, затем замораживали при -40°C и хранили их до использования. После размораживания и механического лизиса клеток комплекс, находящийся в супернатанте в результате лизиса, очищали никелевой аффинной хроматографией (ИМАС) и хранили при -80°C.

Опыт Flashplate CDK2/циклин Е с количеством лунок 96.

Опыт в планшете с 96 лунками, покрытыми стрептавидином, использовали для оценки влияния соединений на киназную активность комплекса CDK2/циклин Е.

Для осуществления этого опыта солибилизовали пептидный биотинилированный субстрат, представляющий собой фрагмент белка pRb (Биотинил-SACPLNPLQNNHTAADMYLSPVRSPPKKK GSTTR-OH), до достижения концентрации 1 мМ в киназном буфере (HEPES/NaOH 50 мМ, NaCl 1 мМ, MgCl<sub>2</sub> 5 мМ, pH 7,5) для получения маточного раствора, хранящегося при температуре -20°C в виде аликвотных частей объемом 110 мкл. В день эксперимента аликвотную часть этого раствора размораживали и разбавляли киназным буфером, содержащим 1 мМ дитиотреитола, вводимым в буфер перед самым употреблением, так, чтобы получить конечную концентрацию пептида 14,3 мкМ. Вносили 70 мкл этого раствора в каждую лунку планшета Flashplate для достижения конечной концентрации субстрата 10 мкМ в процессе ферментативной реакции, проводимой в конечном объеме реакционной среды 100 мкл (см. ниже).

Промежуточные разбавленные растворы ингибиторов (соединений согласно изобретению) с разными концентрациями готовили в ДМСО на основе маточных растворов с концентрацией 10 мМ в отдельных пробирках. Таким образом, осуществляли разбавление до концентраций 1000 мкМ, 333,3 мкМ, 111,1 мкМ, 37,03 мкМ, 12,35 мкМ, 4,11 мкМ и 1,37 мкМ. По 1 мкМ каждого из этих растворов (или 1 мкл ДМСО для контрольных опытов) переносили в лунки тестируемого планшета.

Затем в каждую лунку вводили по 19 мкл раствора смеси аденозинтрифосфата (АТФ) и АТФ<sup>33</sup>Р в киназном буфере с концентрацией 5,26 мкМ итогового АТФ и 52,6 мкКю/мл <sup>33</sup>Р. Ферментативную реакцию начинали добавлением 10 мкл на лунку раствора комплекса CDK2/циклин Е, находящегося в концентрации 200 нМ в киназном буфере, содержащем 1 мМ дитиотреитола (или 10 мкл киназного буфера, содержащего 1 мМ дитиотреитола для контрольных реакций).

После добавления каждого из реагентов конечный объем в каждой лунке составил 100 мкл, конечная концентрация субстрата составила 10 мкМ, конечные концентрации ингибиторов составили 10 мкМ, 3,33 мкМ, 1,11 мкМ, 0,37 мкМ, 0,123 мкМ, 0,041 мкМ и 0,014 мкМ (соответственно концентрациям промежуточного разбавления), конечная концентрация АТФ составила 1 мкМ, конечное содержание <sup>33</sup>Р составило 1,5 мкКю/лунку, конечная концентрация комплекса CDK2/циклин Е составила 20 нМ.

После введения всех реагентов тестируемый планшет инкубировали при 30°C при встряхивании с вращением со скоростью 650 об/мин.

После инкубирования планшет промывали три раза, из расчета 300 мкл на лунку, буфером PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, не содержащим ни кальция, ни магния, номер по каталогу 10010-015, Gibco BRL). Введение <sup>33</sup>Р в пептидный субстрат измерялось путем подсчета методом сцинтилляции на приборе Packard Topcount NXT. Ингибирующая активность соединений согласно изобретению определялась по значению ингибирующей концентрации, вызывающей снижение на 50% активности фермента (CI50).

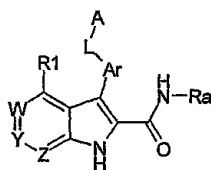
Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Пример	IC50 (нМ)					
	ФАК	KDR	TIE2	Aurora A	Aurora B	CDK2
1	164	29	4	172	138	
2	299	150	21	222	196	
5	249	258	47	131	67	
7	184	34	9	553	133	

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

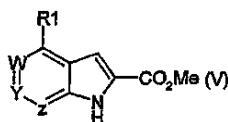
## 1. Соединение формулы (I)



Формула (I)

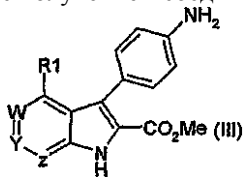
в которой

- 1) Ar представляет собой фенил;
  - 2) A представляет собой фенил, замещенный одной или двумя группами, выбранными из галогена, (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкила, фторированного C<sub>1</sub>-алкила, O-C<sub>1</sub>алкила, фторированного O-C<sub>1</sub>алкила, NHCOCH<sub>3</sub>,
  - 3) L представляет собой NH-CO-NH;
  - 4) один из Y и Z выбирают из N и NO, а другой Y и Z обозначает C(R5) и W обозначает C(R6);
  - 5) R1, R5 и R6 представляют собой H,
  - 6) Ra представляет собой H.
2. Соединение по п.1, в котором Y обозначает N.
  3. Соединение по п.1, в котором Z обозначает N.
  4. Соединение по п.1, в котором Z обозначает NO.
  5. Соединение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что оно находится в форме:
    - 1) нехиральной, или
    - 2) рацемической, или
    - 3) обогащенной стереоизомером, или
    - 4) обогащенной энантиомером,
 и, возможно, в форме соли.
  6. Применение соединения по одному из пп. 1-4 в качестве ингибирующего агента реакции, катализируемой киназой.
  7. Применение по п.6, в котором киназа выбрана из FAK, KDR, Tie2, Aurora A, Aurora B и CDK2.
  8. Применение по п.7, в котором киназа выбрана из KDR и Tie2.
  9. Применение соединений по одному из пп. 1-4 для получения лекарственного средства, пригодного для лечения рака.
  10. Способ получения соединений общей формулы (I), описанной в п.1, отличающийся тем, что соединение общей формулы (V)

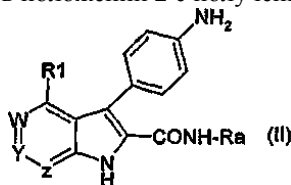


подвергают следующим операциям:

- a) галогенированию в положении 3, затем
- b) сочетанию Сузуки в положении 3 с получением соединения общей формулы (III)



- c) амидированию сложного эфира в положении 2 с получением соединения общей формулы (II)



- d) ацилированию аминофенильной группы в положении 3.

