



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009137779/04, 14.03.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 14.03.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 14.03.2007 GB 0704932.3;
 14.03.2007 US 60/894,752

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2011 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 27.08.2014 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2006136830, A1, 28.12.2006. WO 2005/061463, A1, 07.07.2005. WO 2006136837, A2, 28.12.2006. WO 2006136821, A1, 28.12.2006. RU 2006126789, A, 27.01.2008

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 14.10.2009

(86) Заявка РСТ:
 GB 2008/050180 (14.03.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2008/110846 (18.09.2008)

Адрес для переписки:
 105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
 секция 1, этаж 3, "Евромаркпат"

(72) Автор(ы):

Стивен Джон ВУДХЕД (GB),
 Дэвид Чарлз РИС (GB),
 Мартин ФРЕДЕРИКСОН (GB),
 Кайла Меррион ГРИМШО (GB)

(73) Патентообладатель(и):

АСТЕКС ТЕРАПЬЮТИКС ЛИМИТЕД
 (GB),
 ДЗЕ ИНСТИТЮТ ОФ КЭНСЕ РИСЁЧ
 РОЙАЛ КЭНСЕ ХОСПИТАЛ (GB),
 КЭНСЕ РИСЁЧ ТЕКНОЛОДЖИ
 ЛИМИТЕД (GB)

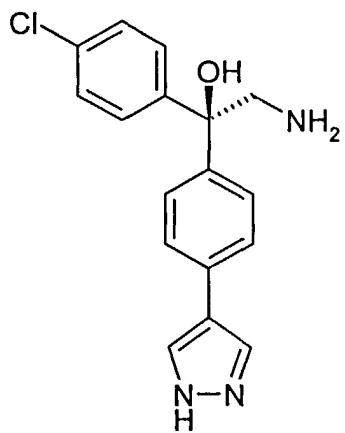
2 5 2 7 1 5 1 C 2

R U

R U 2 5 2 7 1 5 1 C 2

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ (S)-2-АМИНО-1-(4-ХЛОРФЕНИЛ)-1-[4-(1Н-ПИРАЗОЛ-4-ИЛ)ФЕНИЛ]ЭТАНОЛ, В КАЧЕСТВЕ МОДУЛЯТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ

(57) Реферат:
 Изобретение относится к соединению
 формулы (I):



или его соли, сольвату, таутомеру или N-оксиду, где указанное соединение имеет энантиомерную чистоту по крайней мере 80%. Также описаны способы получения (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола, новые промежуточные соединения и способы получения новых промежуточных соединений. 7 н. и 11 з.п. ф-лы, 10 пр.

RU 2527151 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 527 151 (13) C2

(51) Int. Cl.
C07D 231/12 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2009137779/04, 14.03.2008

(24) Effective date for property rights:
14.03.2008

Priority:

(30) Convention priority:
14.03.2007 GB 0704932.3;
14.03.2007 US 60/894,752

(43) Application published: 10.05.2011 Bull. № 13

(45) Date of publication: 27.08.2014 Bull. № 24

(85) Commencement of national phase: 14.10.2009

(86) PCT application:
GB 2008/050180 (14.03.2008)(87) PCT publication:
WO 2008/110846 (18.09.2008)

Mail address:

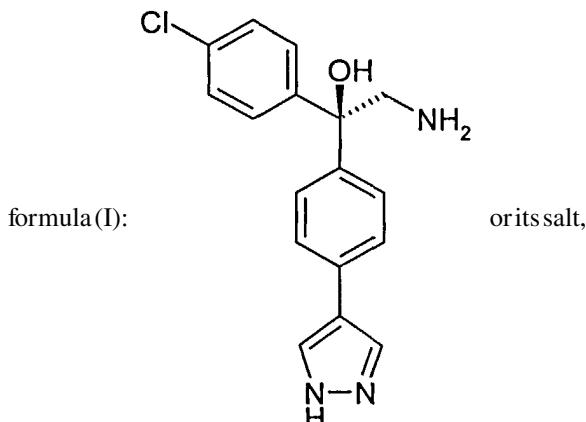
105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
sektsija 1, ehtazh 3, "Evromarkpat"(72) Inventor(s):
Stiven Dzhon VUDKhED (GB),
Dejvid Charlz RIS (GB),
Martin FREDERIKSON (GB),
Kajla Merriom GRIMShO (GB)(73) Proprietor(s):
ASTEKS TERAPJuTIKS LIMITED (GB),
DZE INSTITJuT OF KEhNSE RISECh ROJAL
KEhNSE KhOSPITAL (GB),
KEhNSE RISECh TEKNOLODZhI LIMITED
(GB)R U
2 5 2 7 1 5 1
C 2

(54) COMPOSITIONS, CONTAINING (S)-2-AMINO-1-(4-CHLOROPHENYL)-1-[4-(1H-PYRAZOL-4-YL)PHENYL]ETHANOL AS MODULATORS OF PROTEINKINASES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention relates to compound of



solvate, tautomer or N-oxide, where said compound has enantiomeric purity at least 80%.

EFFECT: described are methods of obtaining (S)-2-amino-1-(4-chlorophenyl)-1-[4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl]ethanol, novel intermediate compounds and methods of obtaining novel intermediate compounds.

18 cl, 10 ex

Настоящее изобретение относится к пиразолсодержащему арилалкиламиносоединению, которое ингибирует или модулирует активность протеинкиназы В (РКВ), протеинкиназы А (РКА), киназы ROCK или киназы p70S6K, к применению этого соединения для лечения или профилактики заболеваний или состояний, опосредованных указанными киназами, и к фармацевтическим композициям, содержащим такое соединение. Более конкретно, настоящее изобретение относится к отдельному энантиомеру 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола, содержащим его фармацевтическим композициям и к его терапевтическим применением, а также к способам его получения и новым способам получения промежуточных соединений.

Уровень техники

Протеинкиназы составляют большое семейство структурно связанных ферментов, которые ответственны за контроль широкого ряда процессов передачи сигнала в клетке (книга Hardie, G. и Hanks, S., 1995, The Protein Kinase Facts Book. I и II, Academic Press, San Diego, CA). Киназы могут классифицироваться на семейства по субстратам, которые они фосфорилируют (например, протеин-тиrosин, протеин-серин/треонин, липиды и т.д.). Идентифицированы участки последовательности, которые обычно соответствуют каждому из этих семейств киназ (например, статьи Hanks, S.K., Hunter, T., FASEB J., 1995, 9, cc.576-596; Knighton и др., Science, 1991, 253, cc.407-414; Hiles и др., Cell, 1992, 70, cc.419-429; Kunz и др., Cell, 1993, 73, cc.585-596; Garcia-Bustos и др., EMBOJ., 1994, 13, cc.2352-2361).

Протеинкиназы могут характеризоваться по их механизмам регулирования. Эти механизмы включают, например, автофосфорилирование, трансфосфорилирование другими киназами, взаимодействия белок-белок, взаимодействия белок-липид и взаимодействия белок-полинуклеотид. Индивидуальная протеинкиназа может регулироваться несколькими механизмами.

Киназы регулируют многочисленные различные клеточные процессы, включая, но не ограничиваясь ими, пролиферацию, дифференциацию, апоптоз, подвижность, транскрипцию, трансляцию и другие процессы передачи сигнала, путем добавления фосфатных групп к целевым белкам. Это фосфорилирование действует как молекулярные выключатели/включатели, которые могут модулировать или регулировать биологическую функцию целевого белка. Фосфорилирование целевого белка происходит в ответ на различные внеклеточные сигналы (гормоны, нейротрансмиттеры, факторы роста и дифференциации и т.д.), фазы клеточного цикла, окружающие или питательные стрессы и т.д. Соответствующими функциями протеинкиназ в путях передачи сигнала являются активация или инактивация (прямо или косвенно), например, метаболического фермента, регулирующего белка, рецептора, цитоскелетного белка, ионного канала или насоса или фактора транскрипции. Неконтролируемая передача сигнала вследствие нарушенного контроля фосфорилирования белка встречается в ряде заболеваний, включая, например, воспаление, рак, аллергию/астму, заболевания и нарушения иммунной системы, заболевания и состояния центральной нервной системы и ангиогенез.

Апоптоз или программируемая гибель клетки является важным физиологическим процессом, который устраниет клетки, не требующиеся больше организму. Процесс является важным на раннем росте эмбриона и развитии, обеспечивая ненекротическое контролируемое разрушение, удаление и восстановление клеточных компонентов. Удаление клеток при апоптозе также важно для поддержания хромосомальной и геномной целостностью популяции растущих клеток. Существует несколько известных контрольных точек в цикле клеточного роста, в которых повреждение ДНК и геномная

целостность внимательно исследуются. Ответом на выявление нарушений в этих контрольных точках является остановка роста таких клеток и начало процессов восстановления. Если повреждение или нарушения не могут быть восстановлены, тогда апоптоз инициируется поврежденными клетками для предотвращения развития дефектов и ошибок. Раковые клетки в целом содержат многочисленные мутации, ошибки или перегруппировки в их хромосомальной ДНК. Предполагается, что это возникает частично из-за того, что большинство опухолей имеют дефект в одном или нескольких процессах, ответственных за инициацию процесса апоптоза. Нормальные контрольные механизмы не могут уничтожить раковые клетки, и ошибки хромосомальных или кодирующих ДНК продолжают распространяться. Поэтому последовательность, восстанавливающая эти проапоптозные сигналы, или подавляющая нерегулируемые сигналы, является привлекательным способом лечения рака.

PKB

Давно известно, что путь передачи сигнала, включающий ферменты

фосфатидилинозитол 3-киназы (PI3K), PDK1 и PKB, среди прочих, медиирует повышенную резистентность к апоптозу или откликам выживаемости в многочисленных клетках. Существует значительное количество данных, показывающих, что этот путь передачи сигнала является важным путем для выживаемости, используемым многими факторами роста для подавления апоптоза. Ферменты семейства PI3K активируются рядом факторов роста и выживаемости, например, EGF, PDGF и выработкой полифосфатидилинозитола, инициируют активацию обратной передачи сигнала, включая активность киназы PDK1 и протенкиназы B (PKB) также известны из предшествующего уровня техники. Это также справедливо для тканей пациента, например, для сосудистых эндотелиальных клеток, а также неоплазий. PKB представляет собой протеинсерин/ треонинкиназу, состоящую из домена киназы вместе с N-терминальным РН доменом и С-терминальным регулирующим доменом. Фермент PKBaipha (aktl), сам фосфорилируемый на Thr 308 с помощью PDK1 и на Ser 473 с помощью 'PDK2', как полагают, состоит из киназы мишени рапамицина (TOR) и его связанного белка rictor. Полная активация требует фосфорилирования на обоих сайтах, тогда как связь PIP3 и РН домена необходима для заякоривания фермента на цитоплазматической поверхности липидной мембраны, обеспечивая оптимальный доступ к субстратам.

Предполагается, что по крайней мере 10 киназ действуют как киназа Ser 473, включая митоген-активируемую протеин (MAP) киназу-активируемую протеинкиназу-2 (МК2), интегриноподобную киназу (ILK), киназу p38 MAP, протеинкиназу Calpha (PKCalpha), PKCbeta, NIMA-связанную киназу-6 (NEK6), мишень рапамицина млекопитающего (mTOR), двухвитковую ДНК-зависимую протеинкиназу (ДНК-РК) и мутированный при атаксии телеангиэкзазии (АТМ) генный продукт. Доступные данные предполагают, что множественные системы могут использоваться в клетках для регулирования активации PKB. Полная активация PKB требует фосфорилирования на обоих сайтах, тогда как связь PIP3 и РН домена необходима для заякоривания фермента на цитоплазматической поверхности липидной мембраны, обеспечивая оптимальный доступ к субстратам. Мутации РН домена недавно были описаны. Авторы приводят прямое доказательство участия АКТ1 в раке человека с помощью структурных биохимических и биологических исследований, и демонстрируют онкогенный потенциал E17K мутации Aktl. Мутация появляется в 5 из 61 (8%) случаев рака груди, в 3 из 51 (6%) случаев рака толстой кишки и в 1 из 50 (2%) случаев рака яичников, (статья Nature, 448, cc.439-444 (26.07.2007) doi: 10.1038/nature 05933; полученной 8.03.2007; подписанной 11.05.2007; опубликованной online 4.07.2007. A transforming mutation in the pleckstrin

homology domain of AKT1 in cancer).

Недавно сообщалось, что соматические мутации в катализической единице PI3K, PIK3CA, являются частыми (25-40%) при раке толстой кишки, желудка, груди, яичников и опухолях высокой степени злокачественности головного мозга. Мутации PIK3CA

являются частыми случаями, которые могут возникать на ранних стадиях при карциногенезе мочевого пузыря. При инвазивных карциномах груди изменения PIK3CA главным образом присутствуют в лобулярных и проточных опухолях. Передача сигнала PI3K значительно активируется при эндометриальных карциномах, и комбинация изменений PIK3CA/PTEN может играть важную роль в развитии этих опухолей. Опухоли активируются мутациями киназы PI3, и потеря PTEN способствует активации PKB, и в результате приводит к непропорциональной чувствительности к ингибиции ингибиторами PKA/PKB.

Активированные PKB в свою очередь фосфорилируют ряд субстратов, участвующих в общем отклике выживаемости. Поскольку мы не можем учесть все факторы, ответственные за медирирование PKB-зависимого отклика выживаемости, некоторыми важными действиями, как полагают, являются фосфорилирование и инактивация проапоптозного фактора BAD и каспазы 9, фосфорилирование факторов транскрипции Форкхеда, например, FKHR, что приводит к их выходу из ядра, и активация передачи сигнала NfkappaB путем фосфорилирования последующих киназ в каскаде.

В дополнение к антиапоптозному действию и действию на пророджаемость PKB, фермент также играет важную роль в промотировании клеточной пролиферации. Это действие, вероятно, опосредуется некоторыми действиями, некоторыми из которых, как полагают, являются фосфорилирование и инактивация ингибитора циклинзависимой киназы p21^{Cip1/WAF1}, и фосфорилирование и инактивация mTOR, киназы, контролирующей некоторые аспекты клеточного размера, роста и трансляции белка.

Фосфатаза PTEN, которая дефосфорилирует и инактивирует полифосфатидилинозитолы, является ключевым белком, подавляющим опухоль, который обычно действует для регулирования PI3K/PKB путем передачи сигнала. Значимость пути передачи сигнала PI3K/PKB при опухолевом генезе может быть подтверждена наблюдением того, что PTEN является одной из наиболее распространенных мишений мутаций в опухолях человека, с мутациями в этой фосфатазе, обнаруженными при ~50% или более меланом (Gulberg и др., Cancer Research, 1997, 57, с.3660-3663) и обширного рака простаты (Cairns и др., Cancer Research, 1997, 57, с.4997). Эти исследования и другие предполагают, что широкий ряд типов опухолей зависит от повышенной активности PKB в отношении роста и выживаемости, и поддавались бы терапевтическому лечению соответствующими ингибиторами PKB.

Существуют 3 тесно связанных изоформы PKB, обозначаемые альфа, бета и гамма (AKT1, 2 и 3), генетическое исследование которых показало различные, но перекрывающиеся функции. Доказательство предполагает, что они все могут независимо участвовать в раке. Например, было обнаружено, что PKB бета сверхэкспрессируется или активируется в 10 - 40% случаев рака яичников и поджелудочной железы (статьи Bellacosa и др., Int. J. Cancer, 1995, 64, с.280-285; Cheng и др., PNAS, 1996, 93, с.3636-3641; Yuan и др., Oncogene, 2000, 19, с.2324-2330), PKB альфа участвует в раке желудка, простаты и груди человека (статьи Staal PNAS, 1987, 84, с.5034-5037; Sun и др., Am. J. Pathol., 2001, 159, с.431-437), и повышенная активность PKB гамма наблюдается в клеточных линиях стероиднезависимого рака груди и простаты (статья Nakatani и др., J. Biol. Chem., 1999, 274, с.21528-21532).

Передача сигнала PKB также участвует в росте и выживании нормальных тканей,

и может регулироваться в процессе нормальной физиологии для контроля клеточной и тканевой функции. Следовательно, нарушения, связанные с нежелательной пролиферацией, и выживаемость нормальных клеток и тканей может также регулироваться терапевтически при лечении ингибитором РКВ. Примеры таких 5 нарушений являются нарушения иммунных клеток, связанные с пролонгированным ростом и выживаемостью клеточной популяции, что приводит к пролонгированному или сверхрегулируемому иммунному отклику. Например, Т и В лимфоциты реагируют на родственные антигены или факторы роста, так, что интерферон гамма активирует путь Р13К/РКВ, и он отвечает за поддержание выживаемости антигенспецифичных 10 лимфоцитных клонов в процессе иммунного отклика. В условиях, в которых лимфоциты и другие иммунные клетки реагируют на несоответствующие собственные или чужеродные антигены, или в которых другие нарушения приводят к пролонгированной активации, путь РКВ составляет важный для выживаемости сигнал, предотвращающий 15 нормальные механизмы, посредством которых иммунный отклик останавливается апоптозом активированной клеточной популяции. Существует значительное количество доказательств, демонстрирующих рост лимфоцитных популяций в ответ на собственные антигены в аутоиммунных условиях, такие как рассеянный склероз и артрит. Рост лимфоцитных популяций в ответ на несоответствующие чужеродные антигены является 20 особенностью другого ряда состояний, таких как аллергические реакции и астма. В суммарном ингибировании РКВ может обеспечивать благоприятное лечение иммунных нарушений.

Другие примеры неподходящего распространения, роста, пролиферации, гиперплазии и выживаемости нормальных клеток, в которых может играть роль РКВ, включают, но не ограничиваются ими, атеросклероз, сердечную миопатию и гломерулонефрит. 25 В дополнение к роли в клеточном росте и выживаемости, передача сигнала РКВ участвует в контроле метаболизма глюкозы при инсулине. Имеющиеся доказательства от мышей с дефицитом альфа и бета изоформ РКВ предполагают, что это действие опосредуется изначально бета изоформой. Как следствие, модуляторы активности РКВ также могут быть полезны при заболеваниях, в которых присутствует дисфункция 30 метаболизма глюкозы и хранения энергии как таковой при диабете, метаболическом заболевании и ожирении.

РКА

Цикло АМФ-зависимая протеинкиназа (РКА) представляет собой серин/ треонинпротеинкиназу, которая фосфорилирует широкий ряд субстратов и участвует 35 в регулировании многочисленных клеточных процессов, включая клеточный рост, клеточную дифференциацию, проводимость ионных каналов, транскрипцию генов и синаптическое высвобождение нейротрансмиттеров. В ее неактивной форме, полный фермент РКА представляет собой тетramer, включающий две регулирующие 40 субъединицы и две катализитических субъединицы.

РКА действует как связь между G-белком, медирующим передачу сигнала, и клеточными процессами, которые они регулируют. Связывание лиганда гормона, такого как глюкагон, с трансмембранным рецептором активирует связанный с рецептором G-белок (GTP-связывание и гидролиз белка). При активации альфа субъединицы G-белка диссоциирует и связывается и активирует аденилаткиназу, которая 45 в свою очередь превращает АТФ в циклоАМФ (цАМФ). Полученная таким образом цАМФ затем связывается с регулирующими субъединицами РКА, что приводит к диссоциации связанных катализитических субъединиц. Катализитические субъединицы РКА, которые являются неактивными при взаимодействии с регулирующими субъединицами,

становятся активными при диссоциации и участвуют в фосфорилировании других регулирующих белков.

Например, каталитическая субъединица РКА фосфорилирует киназу фосфорилазу, которая участвует в фосфорилировании фосфорилазы, фермента, ответственного за разрушение гликогена с высвобождением глюкозы. РКА также участвует в регулировании уровней глюкозы путем фосфорилирования и дезактивации гликогенсинтазы. Так, модуляторы активности РКА (эти модуляторы могут повышать или понижать активность РКА) могут быть полезны для лечения или контроля заболеваний, при которых присутствует дисфункция метаболизма глюкозы и хранения энергии, например, при диабете, метаболическом заболевании и ожирении.

Также установлено, что РКА является действующим ингибитором Т-клеточной активации. Anndahl и др. исследовали возможную роль РКА типа I в вызванной ВИЧ Т-клеточной дисфункции на той основе, что Т-клетки от ВИЧ-инфицированных пациентов имеют повышенные уровни цАМФ, и являются более чувствительными к ингибированию аналогов цАМФ по сравнению с нормальными Т-клетками. Из этих исследований они заключили, что повышенная активация РКА типа I может участвовать в прогрессивной Т-клеточной дисфункции при инфекции ВИЧ, и что РКА типа I, следовательно, может являться потенциальной мишенью для иммуномодулирующей терапии, статья Aandahl, E.M., Aukrust, P., Skalhegg, B.S., Muller, F., Froland, S.S., Hansson, V., Tasken, K. Protein kinase A type I antagonist restores immune responses of T cells from HIV-infected patients, FASEB J., 1998, 12, cc.855-862.

Также установлено, что мутации в регулирующей субъединице РКА могут приводить к гиперактивации в эндокринной ткани.

Из-за разнообразия и важности РКА как мессенджера в клеточном регулировании, нарушенные отклики цАМФ могут приводить к различным вытекающим заболеваниям человека, таким как нарушенный клеточный рост и пролиферация (статья Stratakis, C.A.; Cho-Chung, Y.S.; Protein kinase A and human diseases. Trends Endocrinol. Metab., 2002, 13, cc.50-52). Сверхэкспрессия РКА наблюдается в различных раковых клетках человека, включая клетки пациентов с раком яичников, груди и толстой кишки. Ингибирование РКА, следовательно, может быть подходом для лечения рака (статья Li, Q.; Zhu, G-D.; Current Topics in Medicinal Chemistry, 2002, 2, cc.939-971).

Для обзора роли РКА при заболевании человека см., например, статью Protein kinase A and Human Diseases, под ред. Constantine A. Stratakis, Annals of the New York Academy of Sciences, Т. 968, 2002, ISBN 1-57331-412-9. ROCK киназы Семейство ROCK киназы включает два известных члена: ROCK1 и ROCK2:

ROCK1. Синонимы: Rho-связанная протеинкиназа 1; p160 ROCK; PI 60 ROK; p160 ROCK-1, Rho-связанная, кольцевая-кольцосодержащая протеинкиназа 1; Rho киназа 1; ROK бета.

ROCK2. Синонимы: Rho-связанная протеин киназа 2; p164 ROCK; p164 ROK; p164 ROCK-2; Rho-связанная, кольцевая-кольцосодержащая протеинкиназа 2, Rho киназа 2; ROK альфа.

Процесс метастаза включает реструктуризацию цитоскелета, а также адгезии клетка-клетка и клетка-матрикс, позволяющие клеткам высвобождаться из опухолевой массы, вторгаться в локальные ткани и затем распространяться по организму. Эти действия на клеточную морфологию и адгезию регулируются членами семейства Rho GТРазы.

Активированный RhoA способен взаимодействовать с некоторыми эффекторами белков, включая киназы ROCK ROCK1 и ROCK2. ROCK1 и ROCK2 могут быть активированы комплексом RhoA-GTP посредством физического взаимодействия.

Активированные ROCK фосфорилируют ряд субстратов и играют важные роли в опорных клеточных функциях. Субстраты ROCK включают миозинсвязывающую субъединицу легкой цепи фосфатазы миозина (MBS, также называемая MYPT1), аddyцина, моезина, легкой цепи миозина (MLC), киназы LIM и фактора транскрипции FHL. Фосфорилирование этих субстратов модулируют биологическую активность белков, и обеспечивают средства для изменения клеточного отклика для внешнего стимулирования.

Повышенная экспрессия RhoA и RhoC, а также Rho эффекторы белков ROCK1 и ROCK2, обычно наблюдается при раках человека, включена в прогрессию опухолей яичка эмбриона, малых карцином груди с метастатической способностью, инвазии и метастазы рака мочевого пузыря, прогрессию опухоли при карциноме яичников.

Прогрессия опухолей в инвазивные и метастатические формы требует того, что опухолевые клетки подвергаются сильным морфологическим изменениям, процессам, регулируемым Rho GТРазами. Сократимость актомиозина представляет собой механизм, посредством которого клетки оказывают двигательную силу против их окружения. Обратная передача сигнала малой GТРазой Rho повышает сократимость в ROCK-опосредованном регулировании фосфорилирования легкой цепи миозина-II (MLC2).

Полагают, что ROCK киназы участвуют в индуцировании фокальных адгезий и стрессовых волокон и медирируют кальциевую чувствительность к сократимости гладкой мышцы, повышая фосфорилирование регулирующей легкой цепи миозина.

Исследования *in vivo* также показали, что ингибирование ROCK снижает инвазивность некоторых опухолевых клеточных линий. Ингибиторы ROCK, такие как Y-27632 или WF-536, используют в некоторых испытаниях для демонстрации этих свойств.

Ингибиторы ROCK были предложены для применения для лечения различных заболеваний. Они включают сердечнососудистые заболевания, такие как гипертензия, хроническая и застойная сердечная недостаточность, сердечная гипертрофия, рестеноз, хроническая почечная недостаточность и атеросклероз. Также, благодаря их свойствам в качестве мышечных релаксантов, ингибиторы могут быть полезны при астме, эректильной дисфункции у мужчин, сексуальной дисфункции у женщин и сверхактивном синдроме I мочевого пузыря.

Было показано, что ингибиторы ROCK обладают противовоспалительными свойствами. Таким образом, они могут использоваться для лечения нейровоспалительных заболеваний, таких как инсульт, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, амиотрофический латеральный склероз и воспалительная боль, а также других воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, синдром раздраженного кишечника и воспалительное кишечное заболевание. На основании их индуцирующих действий на рост нейрита, ингибиторы ROCK могли бы быть полезными лекарственными препаратами для нейронной регенерации, вызывая рост новых аксонов и повторное проведение аксонов через повреждения ЦНС. Следовательно, ингибиторы ROCK вероятно полезны для регенеративного лечения нарушений ЦНС, таких как травмы позвоночника, острое нейронное повреждение (инфаркт, травматическое повреждение головного мозга), болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные нарушения. Поскольку ингибиторы ROCK снижают клеточную пролиферацию и клеточную миграцию, они могли бы быть полезны для лечения рака и опухолевых метастаз. Наконец, существует доказательство того, что ингибиторы ROCK подавляют цитоскелетную перегруппировку при вирусной инвазии, поэтому они также имеют потенциальную терапевтическую ценность для противовирусных и антибактериальных

применений. Ингибиторы ROCK также полезны для лечения инсулиновой резистентности и диабета.

Ингибитор ROCK Y-27632

Адгезия опухолевых клеток в клеточные слои хозяина и последующая межклеточная

- 5 миграция являются решающими стадиями в инвазии рака и метастазах. Малая GTPаза Rho контролирует клеточную адгезию и подвижность в реорганизации цитоскелетного актина и регулировании сократимости актомиозина. Клетки гепатомы у культивируемых крыс MM1 мигрируют сывороткозависимым, Rho-опосредованным способом, через мезотелиальный клеточный монослои *in vitro*. Среди некоторых белков, выделенных
- 10 как предполагаемые молекулы мишени Rho, киназы ROCK, как ожидают, участвуют в индуцировании фокальных адгезий и стрессовых волокон в культивированных клетках, и опосредуют кальциевую чувствительность к сокращению гладких мышц путем повышения фосфорилирования регулирующей легкой цепи миозина. Трансфекция клеток MM1 с помощью кДНК, кодирующей основной активный мутант ROCK, выдает
- 15 инвазивную активность независимо от сыворотки и Rho. Наоборот, экспрессия основного отрицательного, киназа-дефективного мутанта ROCK по существу смягчает инвазивный фенотип.

Специфический ингибитор ROCK (Y-27632) блокирует Rho-опосредованную активацию актомиозина и инвазивную активность этих клеток. Кроме того,

- 20 последующая доставка этого ингибитора, используя осмотические насосы, существенно снижает распространения клеток MM1, имплантированных в брюшную полость изогенных крыс. Эти результаты показывают, что ROCK играет существенную роль в инвазии опухолевых клеток, и демонстрируют его потенциал как терапевтическая мишень для профилактики раковой инвазии и метастазирования.

- 25 VEGF вызывает активацию RhoA и забор RhoA в клеточную мембрану ECs человека. Это повышение активности RhoA необходимо для VEGF-индуцированной реорганизации цитоскелетного F-актина, что показано на адено-вирусной трансфекции основного-отрицательного RhoA. Киназа Rho опосредует это действие RhoA, что было показано с использованием Y-27632, специфического ингибитора киназы Rho. Ингибирование киназы Rho предотвращает VEGF-повышенную EC миграцию в ответ на механическое повреждение, но не оказывает действие на базальную миграцию EC. Кроме того, в модели *in vitro* ангиогенеза, ингибирование киназы RhoA или Rho ослабляет VEGF-опосредованный роста EC в 3-мерном фибриновом матриксе. Вывод: VEGF-инициированные цитоскелетные изменения EC требуют киназу RhoA и Rho, и активация
- 30 передачи сигнала киназы RhoA/Rho участвует в VEGF-индуцированной миграции EC *in vitro* и ангиогенезе.

- 35 Y-27632 может расслаблять гладкую мышцу и повышать поток крови в сосудах. Y-27632 является молекулой с низким молекулярным весом, которая может проникать в клетки и не является токсичной для крыс после перорального введения 30 мг/кг в течение
- 40 10 суток. Эффективные дозы для применения этого соединения составляют около 30 мкМ. Оно снижает кровяное давление у крыс с гипертонией, но не влияет на кровяное давление у нормальных крыс. Это может привести к идентификации антагонистов сигнала Rho для лечения гипертензии (статьи Somlyo, *Nature*, 1997, 389, с.908; Uehata и др., *Nature*, 1997, 389, с.990).

- 45 Применение специфического ингибитора ROCK, Y-27632 (статьи Uehata и др., *Nature*, 1997, 389, с.990-994, Davies и др., *Biochemical Journal*, 2000, 351, с.95-105, и Ishizaki и др., *Molecular Pharmacology*, 2000, 57, с.976-983) показало роль этого фермента в Ca^{2+} независимом регулировании сокращения ряда тканей, включая вакулярные (статья

Uehata и др., Nature., 1997, 389, сс.990-994), дыхательные (статья Ilikuka и др., European Journal of Pharmacology., 2000. 406, сс.273-279) и генитальные (статья Chitaley и др., Nature Medicine., 2001. 7(1), сс.119-122) гладкие мышцы. Кроме того, Jezior и др. в статье British Journal of Pharmacology, 2001. 134, сс.78-87, показали, что Y-27632 ослабляет вызванные

5 бетанехолом сокращения у выделенных гладких мышц мочевого пузыря кролика.

Ингибитор киназы Rho Y-27632 тестировали для следующих показаний:

- гипертензия (статьи Uehata и др., IBID, 1997; Chitaley и др., IBID, 2001; Chrissobolis и Sobey, C.Circ. Res, 2001, 88, с.774);

- астма (статьи Iizuka и др., Eur. J. Pharmacol, 2000, 406, с.273; Nakahara и др., Eur. J.

10 Pharmacol, 2000, 389, с.103);

- легочная вазоконстрикция (статья Takamura и др., Hepatology, 2001, 33, с 577);

- васкулярное заболевание (статья Miyata и др., Thromb Vase Biol, 2000, 20, с.2351;

Robertson и др., Br.J. Pharmacol, 2000, 131, с.5);

- эректильная дисфункция полового члена (статья Chitaley и др.. Nature Medicine, 2001,

15 7, с.119; Mills и др., J. Appl. Physiol, 2001, 91, с.1269; Rees и др., Br. J.Pharmacol, 2001, 133, с.455);

- глаукома (статьи Honjo и др.. Methods Enzymol, 2001, 42, с.137; Rao и др., Invest.

Optthalmol. Urs. Sci., 2001, 42, с.1029);

- клеточная трансформация (статья Sahai и др., Curr. Biol., 1999, 9, сс.136-5);

20 - метастазирование рака простаты (статья Somlyo и др., BBRC, 2000, 269, с.652);

- гепатоклеточная карцинома и метастазирование (статьи Imamura и др., 2000; Takamura и др., 2001);

- фиброз печени (статьи Tada и др., J. Hepatol, 2001, 34, с.529; Wang и др., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 2001, 25, с.628);

25 - фиброз почек (статья Ohici и др., J. Heart Lung Transplant, 2001, 20, с.956);

- кардиозащита и приживаемость имплантата (Ohici и др., IBID, 2001);

- церебральный вазоспазм (Sato и др., Circ. Res, 2000, 87, с.195).

Киназа ROCK и сердечнососудистое заболевание

Существует растущее доказательство того, что ROCK, непосредственные прямые

30 мишени малого гунозинтрифосфат-связывающего белка Rho, могут участвовать в сердечнососудистом заболевании. ROCK играют ключевую роль в обратных клеточных функциях, таких как сокращение гладких мышц, образование стрессовых волокон и клеточная миграция и пролиферация. Сверхактивность ROCK наблюдается при церебральной ишемии, коронарном вазоспазме, гипертензии, васкулярном воспалении,

35 артериосклерозе и атеросклерозе. ROCK, следовательно, может быть важной и все еще относительно неисследованной терапевтической мишенью для сердечнососудистого заболевания. Последние экспериментальные и клинические исследования, использующие ингибиторы ROCK, такие как Y-27632 и фасудил, показывают критическую роль ROCK в эмбриональном развитии, воспалении и онкогенезе. Это исследование сфокусировано

40 на потенциальной роли ROCK в клеточных функциях и раскрывает перспективы ингибиторов ROCK в качестве новой терапии сердечнососудистых заболеваний.

Нарушенная сократимость гладких мышц может быть основной причиной заболеваний, таких как гипертензия, и релаксанты гладких мышц, которые модулируют этот процесс, могут использоваться терапевтически. Сократимость гладких мышц

45 регулируется цитозольной концентрацией Ca^{2+} и чувствительностью к Ca^{2+} миофиламентов: первая активирует киназу легкой цепи миозина, а последняя частично достигается ингибированием фосфатазы миозина.

Пути передачи сигнала Rho в гладких мышцах васкулярных клеток высоко

активируются при гипертензии, состоянии, связанном с различными васкулярными заболеваниями, включая рестеноз и атеросклероз.

Гипертензия представляет собой сердечнососудистое заболевание, характеризующееся повышенной периферийной васкулярной резистентностью и/или васкулярным

- 5 структурным ремоделированием. Недавно быстро растущие доказательства на моделях животных с гипертензией показали, что малая GTPаза Rho и ее последующий эффектор, Rho-киназа, играют важную роль в патогенезе гипертензии. Активация передачи сигнала Rho/Rho-киназы является существенной для сократимости гладких мышц при гипертензии. Большая экспрессия RhoA и повышенная активность RhoA наблюдается
- 10 в аортах крыс с гипертонией, таких как крысы с генетической спонтанной гипертонией и вызванной N(омега)-нитро-L-аргининметиловым эфиром гипертонией.

Киназа ROCK и неврологические заболевания

Нарушенная активация передачи сигнала Rho/ROCK наблюдается при различных

- нарушениях центральной нервной системы. Повреждения головного мозга и спинного
- 15 мозга взрослого млекопитающего активируют ROCK, тем самым ингибируя рост и распространение нейрита. Ингибирирование ROCK приводит к ускорению регенерации и повышению функционального восстановления после повреждения спинного мозга у млекопитающих, и также доказано, что ингибирирование передачи сигнала Rho/ROCK является эффективным на моделях животных с инсультом, воспалением и
- 20 демиелинизирующими заболеваниями, болезнью Альцгеймера и нейропатической болью. Следовательно, ингибиторы ROCK могут быть полезны для профилактики нейродегенерации и стимулирования нейрорегенерации при различных неврологических нарушениях.

Развитие нейрона требует ряда стадий, которые начинаются с миграции из места

- 25 появления и инициации процесса внешнего роста, и в конце концов приводят к дифференциации и образованию связи, которая позволяет соединить их с подходящими мишениями. В течение последних нескольких лет стало ясно, что семейство Rho GTPаз и связанные молекулы играют важную роль в различных аспектах нейронного развития, включая внешний рост и дифференциацию нейрита, удлинение аксона и образование
- 30 и поддержание основы дендрита.

Одной общей мерой для ингибирирования внешнего роста нейрита и отталкивания нейрита является перегруппировка актина при росте. Центральным в регулировании цитоскелета актина в нейронных и ненейронных клетках является семейство Rho малых GTPаз. Члены семейства Rho проходят цикл от неактивной GDP-связанной формы до

- 35 активной GTP-связанной формы. Некоторые линии доказательств предполагают, что манипуляция активности состояния Rho GTPаз может модулировать рост конусного разрушения и ингибирирования внешнего роста нейрита.

Недавно, на моделях с поведением показано, что инактивация передачи сигнала Rho может вызывать быстрое восстановление перемещения и прогрессивного восстановления

- 40 координации передняя конечность-задняя конечность. Эти исследования обеспечивают доказательство того, что путь передачи сигнала Rho является потенциальной мишенью для терапевтических вмешательств после повреждения спинного мозга.

Киназа p70S6K

Рибосомальная протеинкиназа p70S6K весом 70 кДа (также известная как SK6, киназа

- 45 p70/p85 S6, p70/p85 рибосомальная киназа S6 и pp70s6k) является членом подсемейства AGC протеинкиназ. p70S6K представляет собой серин-треонинкиназу, которая является компонентом передачи сигнала фосфатидилинозитол 3 киназы (P13K)/АКТ. p70S6K находится ниже PI3K, и активация происходит путем фосфорилирования на ряде сайтов

в ответ на многочисленные митогены, гормоны и факторы роста. Этот ответ может находиться под контролем mTOR, поскольку рапамицин действует на ингибирование активности p70S6K и блокирует синтез белка, особенно в результате прямого регулирования трансляции этих мРНК-кодирующих рибосомальных белков. p70S6K также регулируется PI3K и ее последующей мишенью АКТ. Вортманнин и рапамицин вызывают снижение фосфорилирования p70S6K на сайтах, зависимых от передачи сигнала PI3K. Мутантный p70S6K ингибируется вортманнином, но не рапамицином, предполагая, что передача сигнала PI3K может оказывать действия на p70S6K независимо от регулирования активности mTOR.

Фермент p70S6K модулирует синтез белка путем фосфорилирования рибосомального белка S6. Фосфорилирование S6 сочетается с повышенной трансляцией мРНК, кодирующих компоненты трансляционного аппарата, включая рибосомальные белки и трансляционные факторы удлинения, чья повышенная экспрессия является существенной для клеточного роста и пролиферации. Эти мРНК содержат олигопirimидиновый участок на их 5' транскрипционном старте (называемом 5' TOP), который, как было показано, является существенным для их регулирования на трансляционном уровне.

В дополнение к их участию в трансляции, активация p70S6K также участвует в контроле клеточного цикла, дифференциации нейронных клеток, регулировании клеточной подвижности и клеточного отклика, который является важным при опухолевых метастазах, иммунном отклике и восстановлении тканей. Антитела к p70S6K устраниют митогенный ответ в фибробластах крыс в S фазе, показывая, что функция p70S6K является существенной для развития от G1 до S фазы в клеточном цикле. Другое ингибирование пролиферации клеточного цикла от G1 до S фазы клеточного цикла рапамицином было определено как следствие ингибирования продукции гиперфосфорилированной, активированной формы p70S6K.

Вещество LKB1, подавляющее опухоль, активирует AMPK, который фосфорилирует комплекс TSC1/2 в передаче сигнала mTOR/p70S6K, тем самым способствуя p70S6K в РКВ независимой передаче сигнала. Мутации в LKB1 вызывают полипоз кишечника типа II (PJS), при котором у пациентов с PJS в 15 раз чаще возникает рак по сравнению с обычной популяцией. Кроме того, 1/3 легочных аденокарцином включают неактивированные мутации LKB 1.

Роль p70S6K в пролиферации опухолевых клеток и защите клеток от апоптоза подтверждена на основе его участия в передаче сигнала рецептора фактора роста, сверхэкспрессии и активации в опухолевых тканях. Например, нозерн- и вестерн-анализы показывают, что участие гена PS6K сопровождается соответствующими повышениями мРНК и экспрессии белка, соответственно (статья Cancer Res., 1999, 59, cc. 1408-11 - Localization of PS6K to Chromosomal Region 17q23 and Determination of Its Amplification in Breast Cancer).

Хромосома 17q23 присутствует в 20% ранних опухолей груди, в 87% опухолей груди, содержащих BRCA2 мутации, и в 50% опухолей, содержащих мутации BRCA1, а также в других типах рака, таких как рак поджелудочной железы, мочевого пузыря и нейробластома (см. статью M Barlund, O Monni, J Kononen, R Cornelison, J Torhorst, G Sauter, O-P Kallioniemi и Kallioniemi A, Cancer Res., 2000, 60, cc.5340-5346). Было показано, что распространение 17q23 при раке груди включает гены PAT1, RAD51C, PS6K и SIGMA1B (статья Cancer Res., 2000, 60, cc.5371-5375).

Ген p70S6K идентифицирован как мишень распространения и сверхэкспрессии в этой области, и статистически наблюдается существенная связь между распространением и

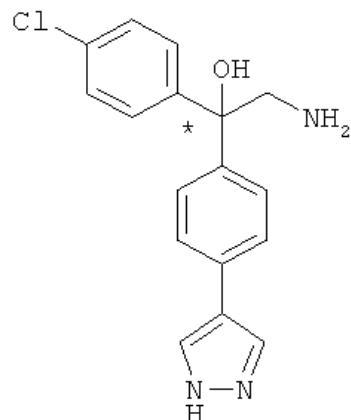
плохим прогнозом.

Клиническое ингибирирование активации p70S6K наблюдается у пациентов с почечной карциномой, подвергающихся лечению CCI-779 (сложный эфир рапамицина), ингибитором предшествующей киназы mTOR. Сообщалось о существенной линейной связи между развитием заболевания и ингибирированием активности p70S6K.

5 p70S6K участвует в метаболических заболеваниях и нарушениях. Сообщалось, что отсутствие p70S6 защищает от возрастного и пищевого ожирения, тем самым повышая чувствительность к инсулину. Роль p70S6K в метаболических заболеваниях и 10 нарушениях, таких как ожирение, диабет, метаболический синдром, резистентность к инсулину, гипергликемия, гипераминоацидемия и гиперлипидемия подтверждена на основе этих исследований.

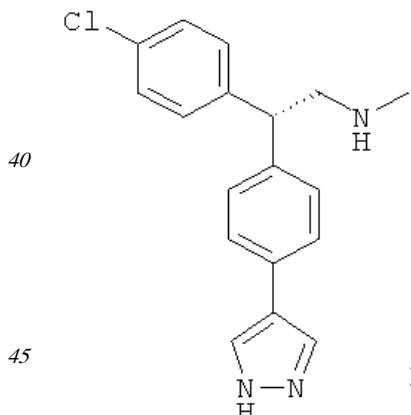
Пиразольные соединения, обладающие ингибирирующей активностью PKB и PKA

Обнаружены некоторые классы соединений, обладающих ингибирирующей активностью в 15 отношении PKA и PKB. Например, в международной заявке на патент WO 2005/061463 (Astex) описаны пиразольные соединения, обладающие ингибирирующей активностью в отношении PKB и PKA, и одно конкретное соединение представляет собой 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол. Это соединение, структура которого показана ниже, имеет хиральный центр при атоме углерода, обозначенном звездочкой.

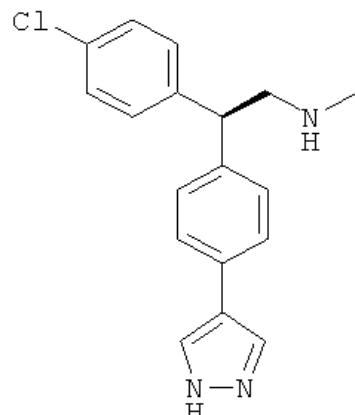


30 Это соединение, описанное в примере 84 международной заявки на патент WO 2005/061463, представляет собой рацемическую смесь двух возможных энантиомеров. В соответствии с примерами 106 и 107, соединение примера 84 имеет значение IC₅₀ в анализе *in vitro* с PKA и PKB соответственно менее 1 мкМ в каждом случае.

35 В международной заявке на патент WO 2005/061463 также описан и раскрыт ряд индивидуальных энантиомеров:

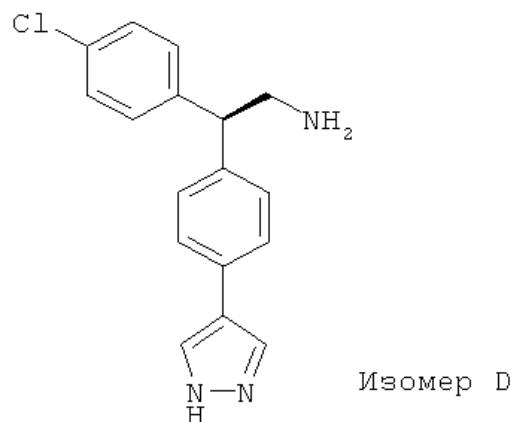
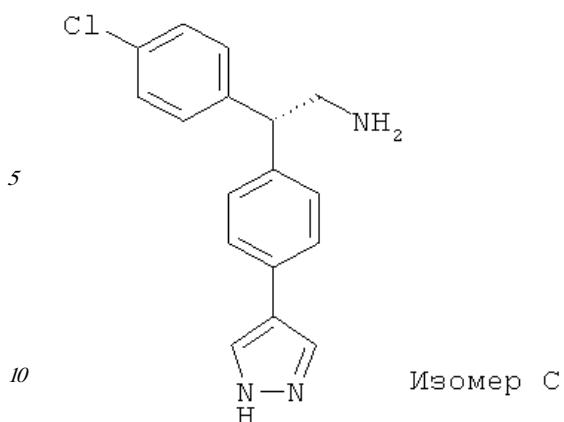


Изомер А



Изомер Б

WO 2005/061463 - Пример 22 WO 2005/061463 - Пример 23



WO 2005/061463 - Пример 30 WO 2005/061463 - Пример 31

Изомеры А и В составляют одну пару энантиомеров, и изомеры С и D составляют другую пару энантиомеров.

15 Тесты, проведенные заявителем, установили, что изомер А обладает в 10 раз большей активностью в отношении РКВ по сравнению с его антиподом изомером В в анализе на связывание. Аналогично, изомер С в 10 раз более активен по сравнению с его антиподом изомером D в анализе на связывание. Однако в механизированном клеточном анализе ELISA, изомеры С и D имеют по существу одну активность.

20 Сущность изобретения

На основании активностей описанных выше изомеров A, B, C и D, можно предположить, что индивидуальные энантиомеры соединения примера 84 в международной заявке на патент WO 2005/061463 также покажут относительно небольшое различие в активности.

Однако совершенно неожиданно было установлено, что 5-энантиомер 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола в 100 раз более активен (что определено по данным радиометрического анализа на связывание) в отношении РКВ по сравнению с соответствующим R-энантиомером. Более того, тогда как изомеры C и D по существу имеют одинаковую активность в механизированном клеточном анализе, и S-энантиомер 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола имеет хорошую активность в этом анализе, активность R-энантиомера не измерялась. При сравнении свойств известных описанных выше индивидуальных энантиомеров A, B, C и D, различие в активности между S- и R-энантиомерами 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола является очень неожиданным и не могло предполагаться.

Из описанного выше следует, что S-энантиомер 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола имеет существенные преимущества по сравнению с его антиподом, R-изомером.

Соответственно, в первом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей (S) 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол, где композиция по существу не содержит (R) 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол, или композиция содержит смесь (S)- и (R)-энантиомеров, среди которых преобладает (S)-энантиomer.

45 Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол или его соль, сольват, таутомер или N-оксид, по крайней мере 75% которого находится в S-энантиомерной форме.

Термин "композиция" как здесь используется обозначает композицию веществ и включает композиции, которые состоят только из 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-

пиразол-4-ил)фенил]этанола, а также композиции, которые содержат дополнительные компоненты. В соответствии с изобретением, по крайней мере, 75% всего 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола, присутствующего в композиции, должно находиться в S-энантиомерной форме. Композиции для удобства могут 5 обозначаться здесь как "композиции по изобретению" или "композиции как здесь определено" или "композиции".

Количество (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола, присутствующего в данной композиции, относительно общего количества 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола обеих энантиомерных форм, 10 присутствующих в композиции, может быть выражено как "энантиомерная чистота". Например, если 75% общего 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола, присутствующего в композиции, находится в форме 5-энантиомера, то энантиомерная чистота составляет 75%.

Предпочтительно, (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол 15 имеет энантиомерную чистоту по крайней мере 80%, более предпочтительно по крайней мере 85%, или по крайней мере 90%, или по крайней мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%.

В предпочтительном варианте осуществления, более 98% 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола находится в S-энантиомерной форме.

20 В другом варианте осуществления, по крайней мере, 99,9% 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола находится в S-энантиомерной форме.

Предпочтительно, (R)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол по существу не присутствует в композиции. Термин "(R)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол по существу не присутствует в композиции" как 25 используется в настоящем описании обозначает, что R-энантиомер не может быть определен описанными здесь аналитическими методами.

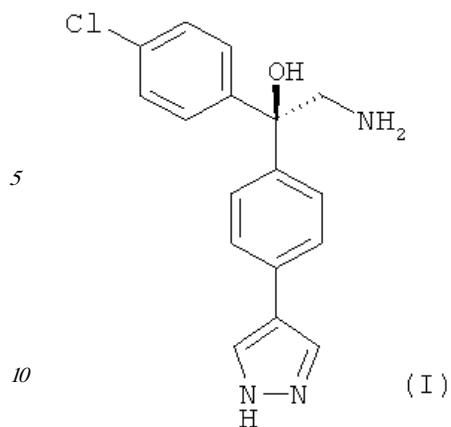
В одном варианте осуществления, композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол или его соль, сольват, таутомер или N-оксид, и фармацевтически приемлемый 30 носитель.

В другом варианте осуществления, композиция состоит из (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида, по существу в чистой форме, то есть содержит менее 0,5%, более предпочтительно менее 0,1% и наиболее предпочтительно менее 0,01% примесей.

35 В предпочтительном варианте осуществления, отдельная примесь не присутствует в композиции в количестве, соответствующем более 0,2% по весу, и предпочтительно более 0,1% по весу.

В другом варианте осуществления, когда известна примесь, предпочтительно, чтобы 40 примесь не присутствовала в композиции в количестве большем 0,5%, или большем 0,4%, или большем 0,3%, или большем 0,2%, или большем 0,1%, или большем 0,05%, или большем 0,01%.

(S)-2-Амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол представлен формулой (I) ниже и может быть обозначен здесь как "соединение формулы (I)" или "5-энантиомер".



(R)-2-Амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол может быть обозначен здесь для удобства как "R-энантиомер".

Термины "R" и "S" как здесь используются обозначают "R и S" номенклатуру, разработанную Каном, Ингольдом и Прелогом, см. книгу Advanced Organic Chemistry от Jerry March, 4^{ое} издание, John Wiley & Sons, New York, 1992, сс.109-114, и см. также книгу Cahn, Ingold & Prelog, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1966, 5, сс.385-415.

Композиции по изобретению могут быть получены частично или полностью разделением смеси (S) и (R) энантиомеров 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола, например, используя хиральную хроматографию, как описано далее.

(S)-2-Амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол (то есть соединение формулы (I)) обладает ингибирующей или модулирующей активностью в отношении протеинкиназы В (РКВ) и/или протеинкиназы А (РКА), и следовательно, полезно для профилактики или лечения заболеваний или состояний, опосредованных РКВ и/или РКА.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к соединению формулы (I), то есть (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанолу, или его соли, сольвату, таутомеру или N-оксиду, по существу в чистой форме, то есть содержащему менее 0,5%, более предпочтительно менее 0,1% и наиболее предпочтительно менее 0,01% примесей.

В одном варианте осуществления, соединение является отличным от N-оксида и выбрано из свободного основания или его соли, сольваты или таутомера.

В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) или его таутомер находится в форме свободного основания.

В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) или его таутомер находится в форме соли. Одна конкретная соль, полученная в соответствии с изобретением, представляет собой соль, образованную с хлористоводородной кислотой.

В других вариантах осуществления, изобретение включает;

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой В.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой В.

- Способ профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой В, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом,

композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольват, таутомера или N-оксида как здесь определено.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для лечения заболевания или состояния,

5 включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольват, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, включающего или возникающего из-за

10 нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего.

- Способ лечения заболевания или состояния, включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста у млекопитающего, который включает введение

15 таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибирования нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток.

- Способ облегчения или снижения проявления заболевания или состояния, включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно

20 остановленной гибели клеток у млекопитающего, который включает введение млекопитающему композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольват, таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибирования нарушенного клеточного роста.

- Способ лечения заболевания или состояния, включающего или возникающего из-

25 за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего, который включает введение млекопитающему композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольват, таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибирования активности протеинкиназы B.

30 - Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для ингибирования протеинкиназы B.

- Способ ингибирования протеинкиназы B, который включает контактирование киназы с ингибирующей киназой композицией или соединением формулы (I), или его солью, сольватом, таутомером или N-оксидом как здесь определено.

35 - Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для модулирования клеточного процесса (например, деления клеток) путем ингибирования активности протеинкиназы B и/или протеинкиназы A.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольват,

40 таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для модулирования клеточного процесса (например, деления клеток) путем ингибирования активности протеинкиназы B и/или протеинкиназы A.

- Способ модулирования клеточного процесса (например, деления клеток) путем ингибирования активности протеинкиназы B и/или протеинкиназы A с помощью

45 композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольват, таутомера или N-оксида как здесь используется.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для профилактики или лечения заболевания

или состояния, опосредованного протеинкиназой А.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного

5 протеинкиназой А.

- Способ профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой А, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

10 - Способ лечения заболевания или состояния, включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего, который включает введение млекопитающему композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибирования активности протеинкиназы

15 А.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для ингибирования протеинкиназы А.

20 - Способ ингибирования протеинкиназы А, который включает контактирование киназы с ингибирующей киназу композицией или соединением формулы (I), или его солью, сольватом, таутомером или N-оксидом как здесь определено.

- Способ модулирования клеточного процесса (например, деления клеток) путем ингибирования активности протеинкиназы А, используя композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено.

25 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания или состояния, возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток.

30 - Фармацевтическую композицию, содержащую композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено, и фармацевтически приемлемый носитель.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено, для применения в медицине.

35 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено, для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения любого одного из описанных здесь заболеваний или состояний.

40 - Способ лечения или профилактики любого одного из описанных здесь заболеваний или состояний, который включает введение пациенту (например, пациенту, нуждающемуся в этом) соединения (например, терапевтически эффективного количества) в композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

45 - Способ облегчения или снижения проявления описанного здесь заболевания или состояния, который включает введение пациенту (например, пациенту, нуждающемуся в этом) соединения (например, терапевтически эффективного количества) в композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

- Способ диагностики и лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой В, который включает (i) скрининг пациента на определение того,

является ли заболевание или состояние, которое имеется у пациента или которому он может быть подвержен, тем заболеванием или состоянием, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы В; и (ii) когда показано, что заболевание или состояние пациента поддается такому лечению, тогда введение пациенту композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, у которого было обнаружено и определено, или находящегося в группе риска, заболевание или состояние, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы В.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, у которого было обнаружено и определено, или находящегося в группе риска, заболевание или состояние, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы В.

- Способ диагностики и лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой А, который включает (i) скрининг пациента на определение того, является ли заболевание или состояние, которое имеется у пациента или которому он может быть подвержен, тем заболеванием или состоянием, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы А; и (ii) когда показано, что заболевание или состояние пациента поддается такому лечению, тогда введение пациенту композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, у которого было обнаружено и определено, или находящегося в группе риска, заболевание или состояние, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы А.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, у которого было обнаружено и определено, или находящегося в группе риска, заболевание или состояние, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы А.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения в качестве модулятора (например, ингибитора) протеинкиназы В и/или протеинкиназы А.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для модулирования (например, ингибирования) протеинкиназы В и/или протеинкиназы А.

- Способ модулирования (например, ингибирования) протеинкиназы В и/или протеинкиназы А; который включает введение протеинкиназы В и/или протеинкиназы А (например, в клеточном окружении, например *in vivo*) в контакт с композицией или соединением формулы (I), или его солью, сольватом, таутомером или N-оксидом как здесь определено.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для: (а) лечения или профилактики заболевания или состояния, для которого показано модулирование (например, ингибиование) киназы ROCK; и/или (б) лечения субъекта или пациента, для которого показано модулирование (например, ингибиование) киназы ROCK.

5 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для применения для: (а) лечения или профилактики заболевания или состояния, для которого показано модулирование (например, ингибиование) киназы ROCK; и/или
10 (б) лечения субъекта или пациента, для которого показано модулирование (например, ингибиование) киназы ROCK.

15 - Способ профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного киназой ROCK, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено.

20 - Способ лечения заболевания или состояния, включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего, который включает введение млекопитающему композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибиования активности киназы ROCK.

25 - Способ ингибиования киназы ROCK, который включает контактирование киназы с ингибирующей киназой композицией или соединением как здесь определено.

30 - Способ модулирования клеточного процесса (например, клеточного деления) путем ингибиования активности киназы ROCK, с помощью композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено.

35 - Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного киназой ROCK.

40 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного киназой ROCK.

45 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания или состояния, возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток, опосредованных киназой ROCK.

50 - Способ облегчения или снижения возникновения заболевания или состояния, включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего, опосредованных киназой ROCK, который включает введение млекопитающему композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибиования нарушенного клеточного роста.

55 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольвата, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения любого одного из описанных здесь заболеваний или состояний.

60 - Способ лечения или профилактики любого одного из описанных здесь заболеваний

или состояний, который включает введение пациенту (например, пациенту, нуждающемуся в этом) композиции или соединения (например, терапевтически эффективного количества) формулы (I) как здесь определено.

- Способ облегчения или снижения возникновения описанного здесь заболевания

5 или состояния, который включает введение пациенту (например, пациенту, нуждающемуся в этом) композиции или соединения (например, терапевтически эффективного количества) формулы (I) как здесь определено.

- Способ диагностики и лечения заболевания или состояния, опосредованного киназой ROCK, который включает (i) скрининг пациента на определение того, является ли

10 заболевание или состояние, которое имеется у пациента или которому он может быть подвержен, тем заболеванием или состоянием, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении киназы ROCK; и (ii) когда показано, что заболевание или состояние пациента поддается такому лечению, тогда введение пациенту композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

15 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, у которого было обнаружено и определено, или находящегося в группе риска, заболевание или состояние,

20 которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении киназы ROCK.

- Композицию или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для: (a) лечения или профилактики заболевания или состояния, для которого показано модулирование (например, 25 ингибирование) протеинкиназы p70S6K; и/или (b) лечения субъекта или пациента, для которого показано модулирование (например, ингибирование) протеинкиназы p70S6K.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для применения для: (a) лечения или профилактики заболевания или состояния, для 30 которого показано модулирование (например, ингибирование) протеинкиназы p70S6K; и/или (b) лечения субъекта или пациента, для которого показано модулирование (например, ингибирование) протеинкиназы p70S6K.

- Способ профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой p70S6K, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, 35 композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

- Способ лечения заболевания или состояния, включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего, который включает введение млекопитающему композиции или 40 соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибирования активности протеинкиназы p70S6K.

- Способ ингибирования протеинкиназы p70S6K, который включает контактирование киназы с ингибирующей киназой композицией или соединением формулы (I), или его 45 солью, сольватом, таутомером или N-оксидом как здесь определено.

- Способ модулирования клеточного процесса (например, клеточного деления) путем ингибирования активности протеинкиназы p70S6K с помощью композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь

определенено.

- Композиции или соединение формулы (I), или его соль, сольват, таутомер или N-оксид как здесь определено для применения для профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой p70S6K.

5 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой p70S6K.

- Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты,

10 таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания или состояния, возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток, опосредованных протеинкиназой p70S6K.

- Способ облегчения или снижения возникновения заболевания или состояния,

15 включающего или возникающего из-за нарушенного клеточного роста или неправильно остановленной гибели клеток у млекопитающего, опосредованных протеинкиназой p70S6K, который включает введение млекопитающему композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено в количестве, эффективном для ингибирования нарушенного клеточного роста.

20 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения любого одного из описанных здесь заболеваний или состояний.

- Способ лечения или профилактики любого одного из описанных здесь заболеваний

25 или состояний, который включает введение пациенту (например, пациенту, нуждающемуся в этом) композиции или соединения (например, терапевтически эффективного количества) формулы (I) как здесь определено.

- Способ облегчения или снижения возникновения описанного здесь заболевания или состояния, который включает введение пациенту (например, пациенту,

30 нуждающемуся в этом) композиции или соединения (например, терапевтически эффективного количества) формулы (I) как здесь определено.

- Способ диагностики и лечения заболевания или состояния, опосредованного протеинкиназой p70S6K, который включает (1) скрининг пациента на определение того, является ли заболевание или состояние, которое имеется у пациента или которому он

35 может быть подвержен, тем заболеванием или состоянием, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы p70S6K; и (ii) когда показано, что заболевание или состояние пациента поддается такому лечению, тогда введение пациенту композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено.

40 - Применение композиции или соединения формулы (I), или его соли, сольваты, таутомера или N-оксида как здесь определено для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, у которого было обнаружено и определено, или находящегося в группе риска, заболевание или состояние, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы p70S6K.

Настоящее изобретение также относится к другим комбинациям, применением, методам, соединениям и способам, приведенным далее в формуле изобретения.

Общие выражения и определения

Как здесь используется, термин "модулирование", в отношении активности киназы, обозначает изменение уровня биологической активности протеинкиназы. Так, модулирование включает физиологические изменения, которые приводят к повышению или снижению относительной активности протеинкиназы. В последнем случае,

5 модулирование может быть обозначено как "ингибиование". Модулирование может осуществляться прямо или косвенно, и может быть опосредовано любым механизмом и на любом физиологическом уровне, включая, например, стадию экспрессии гена (включая, например, транскрипцию, трансляцию и/или послетрансляционную модификацию), стадию экспрессии генов, кодирующих регулирующие элементы, которые 10 влияют прямо или косвенно на уровни активности киназы. Так, модулирование может включать повышенную/пониженную экспрессию или сверхэкспрессию или слабую экспрессию киназы, включая амплификацию гена (то есть получение копий гена) и/или повышенную или пониженную экспрессию транскрипционального эффекта, а также гипер- (или гипо-)активность и (дез)активацию протеинкиназы (протеинкиназ) (включая 15 (дез)активацию) мутацией (мутациями). Термины "модулирующий", "модулирование" и "модулировать" понимаются соответственно.

Как здесь используется, термин "опосредованный", как используется, например, в сочетании с описанной здесь киназой (и использующийся, например, с различными физиологическими процессами, заболеваниями, состояниями, способами лечения, 20 лечениями или внедрениями), обозначает предельно то, что различные процессы, заболевания, состояния, способы лечения и внедрения, к которым применяется термин, являются теми, в которых киназа играет биологическую роль. В случаях, когда термин применяется к заболеванию или состоянию, биологическая роль, выполняемая киназой, может быть прямой или косвенной, и может быть необходимой и/или достаточной для 25 проявления симптомов заболевания или состояния (или его этиологии или прогрессии). Так, активность киназы (и в частности нарушенные уровни активности киназы, например, сверхэкспрессия киназы) необязательно является основной причиной заболевания или состояния: скорее, предполагается, что опосредованные киназой заболевания или состояния включают те, которые имеют многофакторные этиологии 30 и комплексные прогрессии, в которых рассматриваемая киназа только частично участвует. В случаях, когда термин применяется для лечения, профилактики или внедрения, выполняемая киназой роль может быть прямой или косвенной, и может быть необходима и/или достаточна для лечения, профилактики или результата 35 внедрения. Так, заболевание или состояние, опосредованное киназой, включает развитие резистентности к любому конкретному противораковому лекарственному препарату или способу лечения.

Как здесь используется, термины "киназа (киназы) ROCK" и "ROCK" являются синонимичными общими терминами, включающими все члены семейства киназы ROCK, включая ROCK1 и ROCK2 в качестве видов в семействе. Ссылки на ингибиторы киназы 40 ROCK, модулирование киназы ROCK и активность киназы ROCK понимаются соответственно.

Термин "белок Rho" является термином, известным из уровня техники, который используется для обозначения большого семейства GTP-связывающих белков, которые участвуют в регулировании организации актина, включая RhoA и RhoC.

45 Как здесь используется, термин "путь передачи сигнала Rho" обозначает любой клеточный путь передачи сигнала, в котором участвует один или несколько членов белков Rho. Особенно релевантными для изобретения являются пути передачи сигнала Rho, в которых киназа ROCK (например, ROCK1 и/или ROCK2) является

непосредственным эффектором (например, партнером для связывания) для одного или нескольких белков Rho, и такие пути передачи сигнала Rho являются предпочтительными в вариантах осуществления изобретения, обозначенные как путь передачи сигнала Rho.

Как здесь используется, термин "модулирование" в отношении ROCK как здесь

- 5 описано, обозначает изменение уровня биологической активности ROCK. Так, модулирование включает биологические изменения, которые приводят к повышению или понижению активности ROCK. В последнем случае, модулирование может быть обозначено как "ингибиование". Модулирование может осуществляться прямо или косвенно, и может быть опосредовано любым механизмом и на любом физиологическом 10 уровне, включая, например, стадию экспрессии гена (включая, например, транскрипцию, трансляцию и/или послетрансляционную модификацию), стадию экспрессии генов, кодирующих регулирующие элементы, которые влияют прямо или косвенно на уровни активности ROCK, или на уровни активности фермента (например, ROCK) (например, путем аллостерических механизмов, конкурентного ингибиования, инактивации 15 активного сайта, нарушения обратной связи передачи сигнала ингибитора и т.д.). Так, модулирование может включать повышенную/пониженную экспрессию или сверхэкспрессию или слабую экспрессию ROCK, включая амплификацию гена (то есть получение копий гена) и/или повышенную или пониженную экспрессию транскрипционального эффекта, а также гипер- (или гипо-)активность и (дез)активацию 20 ROCK (включая (дез)активацию) мутаций (мутациями). Термины "модулирующий" и "модулировать" понимаются соответственно.

Как здесь используется, термин "опосредованный", как используется в сочетании с ROCK (и использующийся, например, с различными физиологическими процессами, заболеваниями, состояниями, способами лечения, лечениями или внедрениями),

- 25 обозначает предельно то, что различные процессы, заболевания, состояния, способы лечения и внедрения, к которым применяется термин, являются теми, в которых ROCK играют биологическую роль. В случаях, когда термин применяется к заболеванию или состоянию, биологическая роль, выполняемая ROCK, может быть прямой или косвенной, и может быть необходимой и/или достаточной для проявления симптомов заболевания 30 или состояния (или его этиологии или прогрессии). Так, активность ROCK (и в частности нарушенные уровни активности ROCK, например, сверхэкспрессия ROCK) необязательно является основной причиной заболевания или состояния: скорее, предполагается, что опосредованные ROCK заболевания или состояния включают те, которые имеют многофакторные этиологии и комплексные прогрессии, в которых 35 ROCK только частично участвует. В случаях, когда термин применяется для лечения, профилактики или внедрения (например, в "ROCK-опосредованных способах лечения" и "ROCK-опосредованной профилактике" по изобретению) выполняемая киназой роль может быть прямой или косвенной, и может быть необходима и/или достаточна для лечения, профилактики или результата внедрения. Многочисленные ROCK- 40 опосредованные физиологические процессы, заболевания, состояния, способы лечения, терапии или внедрения по изобретению включают передачу сигнала Rho (как здесь определено), и следовательно, при обобщении, могут называться "Rho-опосредованные" физиологические процессы, заболевания, состояния, терапии, способы лечения или внедрения.

- 45 Термин "показанный" является термином, известным из уровня техники, использующийся здесь в отношении заболевания, состояния, субъекта или пациента с клинической потребностью или необходимостью конкретного вмешательства в это заболевание, состояние, этому субъекту или пациенту. Так, ссылки на заболевание,

состояние, субъект или пациента, "для которого показано модулирование (например, ингибирование) киназы ROCK" обозначают те заболевания и т.д., в которых модулирование киназы ROCK является клинически желательным или необходимым. Это может быть случай, например, в котором модулирование киназы ROCK будет 5 смягчающим, предотвращающим или (по крайней мере частично) излечивающим.

Как здесь используется, термин "модулирование", в отношении используемой здесь протеинкиназы P70S6K, обозначает изменение уровня биологической активности P70S6K. Так, модулирование включает биологические изменения, которые приводят к повышению или снижению активности P70S6K. В последнем случае, модулирование 10 может быть обозначено как "ингибирование". Модулирование может осуществляться прямо или косвенно, и может быть опосредовано любым механизмом и на любом физиологическом уровне, включая, например, стадию экспрессии гена (включая, например, транскрипцию, трансляцию и/или посттрансляционную модификацию), 15 стадию экспрессии генов, кодирующих регулирующие элементы, которые влияют прямо или косвенно на уровни активности P70S6K, или на уровни активности фермента (например, P70S6K) (например, путем аллостерических механизмов, конкурентного ингибирования, инактивации активного сайта, нарушения обратной связи передачи сигнала ингибитора и т.д.). Так, модулирование может включать повышенную/ пониженную экспрессию или сверхэкспрессию или слабую экспрессию P70S6K, включая 20 амплификацию гена (то есть получение копий гена) и/или повышенную или пониженную экспрессию транскрипционального эффекта, а также гипер- (или гипо-)активность и (дез)активацию P70S6K (включая (дез)активацию) мутацией (мутациями). Термины "модулирующий" и "модулировать" понимаются соответственно.

Как здесь используется, термин "опосредованный", как используется в сочетании с

25 P70S6K (и использующийся, например, с различными физиологическими процессами, заболеваниями, состояниями, способами лечения, леченими или внедрениями), обозначает предельно то, что различные процессы, заболевания, состояния, способы лечения и внедрения, к которым применяется термин, являются теми, в которых P70S6K играют биологическую роль. В случаях, когда термин применяется к заболеванию или 30 состоянию, биологическая роль, выполняемая P70S6K, может быть прямой или косвенной, и может быть необходимой и/или достаточной для проявления симптомов заболевания или состояния (или его этиологии или прогрессии). Так, активность P70S6K (и в частности нарушенные уровни активности P70S6K, например, сверхэкспрессия P70S6K) необязательно является основной причиной заболевания или 35 состояния: скорее, предполагается, что опосредованные P70S6K заболевания или состояния включают те, которые имеют многофакторные этиологии и комплексные прогрессии, в которых P70S6K только частично участвует. В случаях, когда термин применяется для лечения, профилактики или внедрения (например, в "P70S6K-опосредованных способах лечения" и "P70S6K-опосредованной профилактике" по 40 изобретению) выполняемая киназой роль может быть прямой или косвенной, и может быть необходима и/или достаточна для лечения, профилактики или результата внедрения.

45 Термин "внедрение" является термином, используемым в уровне техники, который обозначает любое действие, которое производит физиологическое изменение на любом уровне. Так, внедрение может включать индуцирование или подавление любого физиологического процесса, события, биохимического пути передачи сигнала или клеточного/биохимического процесса. Внедрения по изобретению обычно включают (или составляют) терапию, лечение или профилактику заболевания или состояния.

Если в контексте не указано иное, ссылка на (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол, или соединение формулы (I) или S-энантиомер, включает свободное основание, а также его формы иона, соли, сольвата, N-оксида, таутомерные и, защищенные формы, например, как описано далее.

5 Соединение может быть отличным от N-оксида. Например, в одном варианте осуществления, соединение формулы (I) является отличным от N-оксида и представляет собой форму свободного основания.

В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) является отличным от N-оксида и представляет собой форму соли.

10 Формы соли могут быть выбраны и получены в соответствии со способами, описанными в книге *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.Heinrich Stahl (ред.), Camille G.Wermuth (ред.), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, с. 388, август 2002.

Например, кислотные аддитивные соли могут быть получены растворением свободного основания в органическом растворителе, в котором указанная форма соли является 15 нерастворимой или плохо растворимой, и затем добавлением необходимой кислоты в подходящем растворителе, так, что соль осаждается из раствора.

Кислотные аддитивные соли могут быть образованы с широким рядом кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотные аддитивных солей включают соли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-20 дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+) камфорной, камфорсульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламиновой, додуцилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, 25 фумаровой, молочной, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), а-оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной, изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной и (±)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (±)-DL-30 миндальной, метансульфоновой, нафталенсульфоновой (например, нафтален-2-сульфоновой), нафтален-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, 35 толуолсульфоновой (например, n-толуолсульфоновой), ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированные аминокислоты и катионообменные смолы.

Одна конкретная группа кислотных аддитивных солей включает соли, образованные с хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, 40 бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, метансульфоновой, этансульфоновой, нафталенсульфоновой, валериановой, уксусной, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислотами. В эту группу солей входят соли, образованные с хлористоводородной кислотой или уксусной кислотой.

Другая группа кислотных аддитивных солей включает соли, образованные с уксусной, 45 адипиновой, аскорбиновой, аспарагиновой, лимонной, DL-молочной, фумаровой, глюконовой, глюкуроновой, гиппуровой, хлористоводородной, глутаминовой, DL-яблочной, метансульфоновой, себациновой, стеариновой, янтарной и винной кислотами.

Соединение формулы (I) может существовать в форме моно- или дисолей в

5 зависимости от значения рKa кислоты, из которой получена соль. В более сильных кислотах, основный азот пиразола, а также атом азота в аминогруппе, может принимать участие в получении соли. Например, когда кислота имеет значение рKa менее 3 (например, кислота, такая как хлористоводородная кислота, серная кислота или трифтормукусная кислота), соединение формулы (I) обычно образует соли с 2 молярными эквивалентами кислоты.

10 Формы соли соединения формулы (I) обычно являются фармацевтически приемлемыми солями, и примеры фармацевтически приемлемых солей описаны в книге Berge и др., 1977, "Pharmaceutical Acceptable Salts", J. Pharm. Sci., T. 66, cc.1-19. Однако соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут быть получены в качестве промежуточных форм, которые затем могут быть превращены в фармацевтически приемлемые соли. Такие формы фармацевтически неприемлемых солей, которые могут быть полезны, например, для очистки или разделения соединения формулы (I), также составляют часть изобретения.

15 Соединение формулы (I) также могут образовывать N-оксиды, и такие N-оксиды входят в объем определения соединения формулы (I).

В одном общем варианте осуществления, соединение формулы (I) не находится в форме N-оксида.

20 N-Оксиды могут быть получены обработкой исходного амина окисляющим агентом, таким как перекись водорода или перокислота (например, пероксикарбоновая кислота), см., например, книгу Advanced Organic Chemistry, Jerry March, 4^{ое} издание, Wiley Interscience. Более конкретно, N-оксиды могут быть получены методикой, описанной в статье L.W.Deady (Syn. Comm., 1977, 7, cc.509-514), в которой аминосоединение подвергают реакции с м-хлорпероксибензойной кислотой (МСРВА), например, в 25 инертном растворителе, таком как дихлорметан.

25 Соединение формулы (I) может быть получено из рацемической смеси S-энантиомера и R-энантиомера, используя подходящие методики разделения, такие как хиральная хроматография (хроматография на хиральном носителе), и такие методики хорошо известны специалисту из предшествующего уровня техники.

30 В качестве альтернативы хиральной хроматографии, энантиомеры могут быть разделены путем образования диастереоизомерных солей с помощью хиральных кислот, таких как (+)-винная кислота, (-)-пироглутаминовая кислота, (-)-дитолуоил-L-винная кислота, (+)-миндальная кислота, (-)-яблочная кислота и (-)-камфорсульфоновая кислота, 35 разделяя диастереоизомеры фракционной кристаллизацией, и затем растворяя соли с получением индивидуального энантиомера свободного основания.

35 Соединение формулы (I) включает варианты с одним или несколькими изотопными замещениями, и ссылка на конкретный элемент включает в свой объем все изотопы элемента. Например, ссылка на водород включает в свой объем ¹H, ²H (D) и ³H (T).

40 Аналогично, ссылки на углерод и кислород включают в их объем соответственно ¹²C, ¹³C и ¹⁴C и ¹⁶O и ¹⁸O.

45 Изотопы могут быть радиоактивными или нерадиоактивными. В одном варианте осуществления изобретения, соединения не содержат радиоактивных изотопов. Такие соединения являются предпочтительными для терапевтического применения. В другом варианте осуществления, однако, соединение может содержать один или несколько радиоизотопов. Соединения, содержащие такие радиоизотопы, могут быть полезны в целях диагностики.

Также в формулу (I) включены любые полиморфные формы соединений, сольваты

(например, гидраты), комплексы (например, комплексы включения или клатраты с соединениями, такими как циклодекстрины, или комплексы с металлами) соединений, и пролекарства соединений. Под "пролекарствами" понимают, например, любое соединение, которое превращается *in vivo* в биологически активную композицию как

5 здесь определено.

Например, некоторые пролекарства представляют собой сложные эфиры активного соединения (например, физиологически приемлемый метаболически лабильный сложный эфир). В процессе метаболизма, сложноэфирная группа (-C(=O)OR) отщепляется с получением активного лекарственного препарата. Такие сложные эфиры могут быть

10 получены этерификацией, например, любой гидроксильной группы (-C(=O)OH) в исходном соединении, если подходит, до защиты любых других реакционных групп, присутствующих в исходном соединении, с последующим снятием защит при необходимости.

Примеры таких метаболически лабильных сложных эфиров включают эфиры

15 формулы -C(=O)OR, где R представляет собой:

C₁₋₇алкил (например, -Me, -Et, -nPr, -изоСr, -nBu, -вторBu, -изоВu, -третBu);

C₁₋₇аминоалкил (например, аминоэтил; 2-(N,N-диэтиламино)этил; 2-(4-морфолино)этил); и

20 ацилокси-C₁₋₇алкил (например, ацилоксиметил; ацилоксиэтил; пивалоилоксиметил; ацетоксиметил; 1-ацетоксиэтил; 1-(1-метокси-1-метил)этилкарбонилоксиэтил; 1-(бензоилокси)этил;

изопропоксикарбонилоксиметил; 1-изопропоксикарбонилоксиэтил; циклогексилкарбонилоксиметил; 1-циклогексилкарбонилоксиэтил; циклогексилоксикарбонилоксиметил; 1-циклогексилоксикарбонилоксиэтил; (4-тетрагидропиранилокси)карбонилоксиэтил; (4-тетрагидропиранил)карбонилоксиметил и 1-(4-тетрагидропиранил)карбонилоксиэтил).

Также, некоторые пролекарства активируют ферментативно с получением активного соединения, или соединения, которое после последующей химической реакции приводит

30 к получению активного соединения (например, антитело-направленная ферментативная пролекарственная терапия (ADEPT), ген-направленная ферментативная пролекарственная терапия (GDEPT), полимер-направленная ферментативная пролекарственная терапия (PDEPT), лиганд-направленная ферментативная пролекарственная терапия (LIDEPТ) и т.д.). Например, пролекарством может быть

35 производное сахара или другой гликозидный конъюгат, или может быть производное сложного эфира аминокислоты.

Способы синтеза

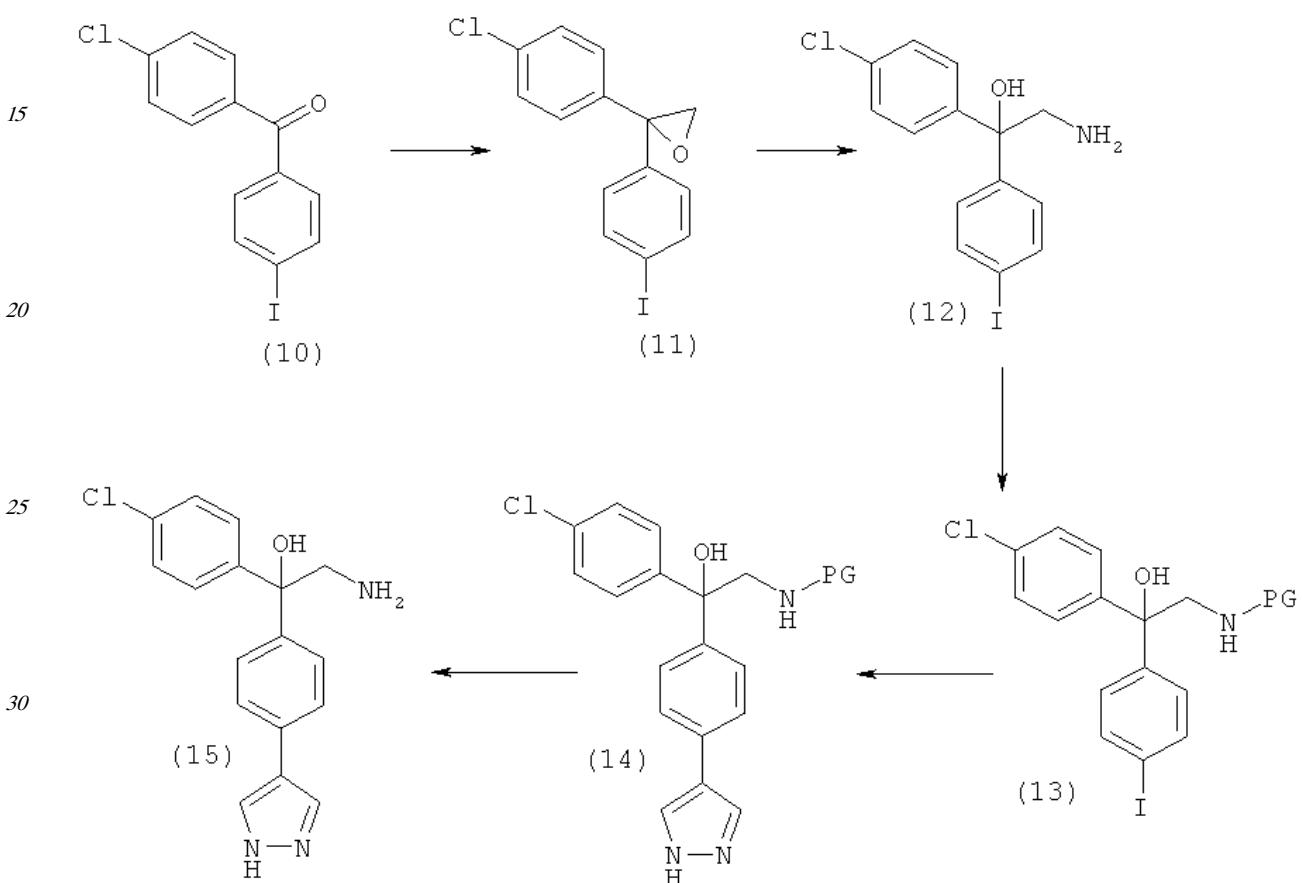
Соединение формулы (I) и его R-энантиомер и их смеси могут быть получены способами, показанными на схеме 1.

40 На схеме 1, замещенный бензофенон (10) превращают в эпоксид (11) реакцией с йодидом триметилсульфония в диметилсульфоксиде в присутствии основания (например, основания гидрида, такого как гидрид натрия). Эпоксид (11) затем подвергают реакции с аммиаком в спиртовом растворителе, таком как метанол, обычно при нагревании, с получением амина (12) в виде рацемической смеси R- и «S'-энантиомеров.

45 Амин (12) может подвергаться реакции непосредственно с пиразолборонатом (таким как 4-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразол) в присутствии палладиевого катализатора (такого как тетракистрифенилфосфин палладий (0)) в условиях конденсации Сузуки с получением рацемического соединения (15). Однако,

было обнаружено, что реакция незащищенного амина в условиях конденсации Сузуки приводит к относительно низким выходам продукта, и продукт относительно трудно очистить из-за его низкой растворимости. Эта проблема преодолевается первичной защищенной аминогруппы (например, с помощью Вос-группы, где PG=Boc) с получением 5 защищенного промежуточного соединения (13), и затем конденсацией Сузуки промежуточного соединения (13) с получением защищенного соединения (14). С защищенным соединением (14) затем снимают защитные группы хорошо известными способами (например, используя HCl в смеси диэтиловый эфир/метанол, когда PG=Boc) с получением продукта (15) в виде рацемической смеси.

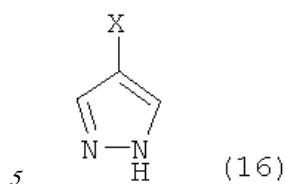
10 Схема 1



35 Рацемическая смесь (15) может быть разделена способами, хорошо известными специалисту в данной области техники, например, используя методы хиральной хроматографии и другие описанные здесь методы.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу 40 получения соединения формулы (15), который включает удаление защитной группы PG с соединения (14), и затем необязательное разделение оптических изомеров соединения (15) и выделение его S-энантиомера. Настоящее изобретение также относится к соединению, полученному описанным выше способом, а также к соединению формулы (15), полученному указанным способом.

45 В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы (15), который включает (i) реакцию соединения формулы (13) с производным пиразола формулы (16):



где X представляет собой группу $\text{B}(\text{OH})_2$ или боронатную сложноэфирную группу (такую как 4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]диоксаборолан-2-ильная группа) в присутствии палладиевого катализатора (такого как тетракистрифенилфосфин палладий (0)) в условиях конденсации Сузуки с получением соединения формулы (14); (ii) удаление 10 защитной группы PG с соединения (14), и затем (iii) необязательное разделение оптических изомеров соединения (15) и выделение его S-энантиомера.

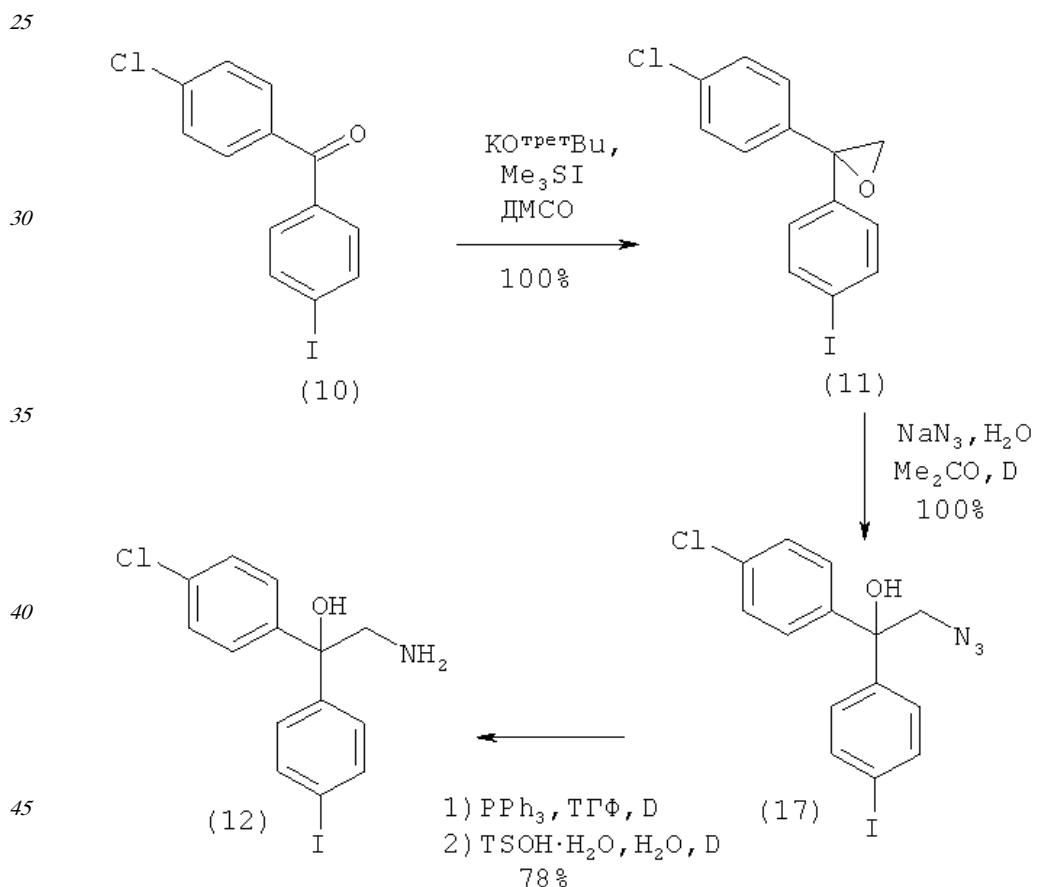
Промежуточные соединения формулы (13), особенно когда PG представляет собой Вос-группу, составляют другой вариант осуществления по изобретению.

Новые промежуточные соединения формулы (14), где PG является отличным от 2-15 карбоксибензоильной группы, также составляет другой вариант осуществления по изобретению. Предпочтительное промежуточное соединение (14) представляет собой соединение, где PG представляет собой Вос-группу.

В качестве альтернативы к описанным выше и иллюстрированным на схеме 1 способам, соединение формулы (I) может быть получено способом, описанным в 20 примере 84 международной заявки на патент WO 2005/061463 (Astex), и затем выделением S-энантиомера методами разделения, описанными выше и где-либо еще.

Улучшенный способ получения промежуточного соединения (12) приведен на схеме 2.

Схема 2



На схеме 2 замещенный бензофенон (10) превращают в эпоксид (11) реакцией с

йодидом триметилсульфония в диметилсульфоксида в присутствии основания, как описано выше на схеме 1, за исключением того, что основание гидрид натрия заменяют на трет-бутоксид, калия. трет-Бутоксид, калия добавляют к быстро перемешиваемой смеси бензофенона (10) и йодида триметилсульфония, обычно при комнатной

- 5 температуре. Применение трет-бутоксида калия в качестве основания в отличие от гидрида натрия имеет существенные преимущества. Во-первых, до образования димсильного аниона в реакции основания с ДМСО и затем добавление других реагентов, как при использовании гидрида натрия в качестве основания, трет-бутоксид, может добавляться к полученной смеси бензофенона (10), йодида триметилсульфония и диметилсульфоксида. Это обозначает, что димсильный анион исчезает очень быстро после его образования, и следовательно, только небольшие количества димсильного аниона присутствуют в реакционной смеси в любое данное время. Следовательно, использование трет-бутоксида калия приводит к образованию больших концентраций относительно вязкого и немного опасного димсильного натрия. В дополнение к 15 повышению безопасности процесса, отсутствие больших концентраций вязкого димсильного натрия обозначает, что реакционная смесь является более легкой для перемешивания, позволяя осуществить более эффективное перемешивание реагентов и избежание локализованных сгустков непрореагировавшего или неполностью прореагировавшего материала, преимущество, которое повышается тем фактом, что 20 трет-бутанол, образующийся в результате реакции, является хорошим растворителем для реагентов и продукта. Эти преимущества особенно видны, когда реакцию осуществляют в большом масштабе (например, для получения количеств 50 граммов или более эпоксида (11), когда было обнаружено, что применение трет-бутоксида калия приводит к существенно лучшим выходам эпоксида (11) и лучшей чистоте (по сравнению 25 с реакциями с помощью гидрида натрия в качестве основания).

В реакционной последовательности, показанной на схеме 1, эпоксид (11) подвергают реакции с аммиаком в спиртовом растворителе, таком как метанол, при нагревании, с получением амина (12). Реакции этого типа могут осуществляться в микроволновом реакторе, обычно под давлением, и приводят к получению хороших выходов и чистоты 30 в относительно небольших масштабах реакций.

Однако для реакций большого масштаба (например, для получения количеств 50 грамм или более амина (12)), было обнаружено, что реакция эпоксида (11) с азидом натрия и затем восстановление азидного промежуточного соединения (17) до амина (12) приводит к получению лучших выходов и лучшей чистоты. Реакцию эпоксида (11) 35 с азидом натрия обычно осуществляют в полярном растворителе, например, в водном растворителе, содержащем воду и смешиваемый с водой растворитель, такой как ацетон. Реакцию обычно осуществляют при нагревании, например, при температуре кипения системы растворителя.

Превращение азидоспирта (17) в аминоспирт (12) может осуществляться реакцией с 40 трифенилфосфином с последующей обработкой водным раствором кислоты и особенно водным раствором замещенной сульфоновой кислоты, предпочтительно алкил- или арилсульфоновой кислоты, такой как метансульфоновая кислота, этан сульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, толуолсульфоновая кислота или камфорсульфоновая кислота. Применение 4-толуолсульфоновой кислоты является 45 особенно предпочтительным. Не придерживаясь какой-либо теории, предполагается, что реакция протекает при первичной циклизации с образованием азиридина с последующим раскрытием кольца в присутствии кислоты с получением аминоспирта. При использовании кислоты (особенно 4-толуолсульфоновой кислоты), аминоспирт

может быть выделен в виде стабильной, удобной для использования соли, и легко очищаться. Если используется оптически активная форма камфорсульфоновой кислоты (например, d-камфорсульфоновая кислота), фракционная кристаллизация соли может использоваться для разделения индивидуальных солей двух энантиомеров аминоспирта 5 (12). Последующая обработка солей основанием приводит к получению индивидуальных энантиомеров аминоспирта (12).

Азидное соединение (17), аминоспирт (12) и его индивидуальные энантиомеры и кислотные аддитивные соли аминоспирта (12) и его энантиомеров, как предполагается, являются новыми, и как таковые составляют другие варианты осуществления по 10 изобретению.

Так, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-йодфенил]этанолу и его кислотным аддитивным солям как здесь определено.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к (R)-2-амино-15 1-(4-хлорфенил)-1-[4-йодфенил]этанолу и его кислотным аддитивным солям как здесь определено.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к (5)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-йодфенил]этанолу и его кислотным аддитивным солям как здесь определено.

20 В каждом из вышеизложенных трех вариантов осуществления, предпочтительными кислотными аддитивными солями являются соли, образованные с метансульфоновой кислотой, этансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, толуолсульфоновой кислотой или камфорсульфоновой кислотой (например, d-камфорсульфоновой кислотой). Особенно предпочтительной солью является соль, образованная с 4-25 толуолсульфоновой кислотой.

В дополнение к полезности в качестве синтетического промежуточного соединения, соединение формулы (12) и его кислотные аддитивные соли обладают активностью в отношении киназы РКВ, и как таковые могли бы быть полезны для лечения, и особенно для применений (например, противораковых применений), описанных здесь для 30 соединения формулы (I). Фармацевтические композиции, содержащие соединение формулы (12) или кислотную аддитивную соль как здесь определено и его фармацевтически приемлемый носитель, и терапевтические применения соединения формулы (12) или его кислотных аддитивных солей составляют другие варианты осуществления по изобретению.

35 В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения оптически активной формы соединения формулы (12), который включает фракционную кристаллизацию кислотной аддитивной соли соединения формулы (12), где соль получена из оптически активной кислоты (например, d-камфорсульфоновой кислоты).

40 В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы (12) как здесь определено, который включает реакцию соединения формулы (17) с третичным фосфином, таким как трифенилфосфин, в полярном аprotонном растворителе, таком как тетрагидрофуран, при температуре около комнатной температуры (например, при температуре кипения растворителя) с 45 последующей обработкой водным раствором кислоты, например, замещенной сульфоновой кислоты, такой как 4-толуолсульфоновая кислота.

В качестве альтернативы трифенилфосфина могут использоваться другие третичные фосфины, и они включают другие триарилфосфины, такие как тритолилфосфин,

триалкилфосфины, такие как трибутилфосфин, трициклоалкилфосфины, такие как трициклогексилфосфин, и третичные фосфины, содержащие смеси арильных и/или алкильных и/или циклоалкильных групп. Однако трифенилфосфин является предпочтительным.

5 В качестве альтернативы 4-толуолсульфоновой кислоты могут использоваться другие замещенные сульфоновые кислоты; например, алкил- и арилсульфоновая кислота, такая как метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота и камфорсульфоновая кислота, как описано выше.

10 В другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения соединения формулы (17); который включает реакцию эпоксидного соединения формулы (11) с азидом щелочного металла (например, азидом натрия) или триметилсилазидом (TMS-азидом) в полярном растворителе (например, водный органический растворитель, такой как водный ацетон), предпочтительно при нагревании (например, при температуре кипения растворителя).

15 В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы (12), который включает стадии:

(а) реакции соединения формулы (11) как здесь определено с азидом щелочного металла (таким как азид натрия) или триметилсилазидом, с получением соединения формулы (17);

20 (б) реакции соединения формулы (17) с (i) третичным фосфином, таким как трифенилфосфин, затем с (ii) кислотой, такой как, например, замещенная сульфоновая кислота, предпочтительно алкил- или арилсульфоновая кислота, такая как метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота или толуолсульфоновая кислота, и наиболее предпочтительно 4-толуолсульфоновая кислота.

25 В каждом из описанных выше способов, включающих применение азида, азида щелочного металла (например, азид лития, азид калия и азид натрия) являются предпочтительными, и азид натрия является наиболее предпочтительным.

30 В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы (15), 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола; который включает:

(1) получение соединения формулы (12) способом, как здесь определено;

(2) защиту аминогруппы соединения формулы (12) способом, как здесь определено, с получением соединения формулы (13);

(3) реакцию соединения формулы (13) с пиразольным производным формулы (16)

35 как здесь определено в присутствии палладиевого катализатора (такого как тетракистрифенилфосфинпалладий (0)) в условиях конденсации Сузуки с получением соединения формулы (14);

(4) удаление защитной группы PG с соединения формулы (14); и необязательно затем

(5) разделение оптических изомеров соединения (15) и выделение его S-энантиомера.

40 Фармацевтические составы

Хотя для соединения формулы (I) возможно раздельное введение, предпочтительно, чтобы композиция по изобретению представляла фармацевтическую композицию (например, состав), включающую соединение формулы (I) вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, адьювантами, эксципиентами, 45 разбавителями, наполнителями, буферами, стабилизаторами, консервантами, лубрикантами или другими материалами, хорошо известными специалисту в данной области техники, и необязательно другими терапевтическими или профилактическими агентами.

Так, настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, как определено выше, и способам получения фармацевтической композиции, включающим смешение соединения формулы (I) с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами, буферами, адьювантами, стабилизаторами или другими материалами, как здесь описано.

Термин "фармацевтически приемлемый" как здесь используется относится к соединениям, материалам, композициям и/или дозированным формам, которые в рамках озвученного медицинского применения подходят для применения в контакте с тканями субъекта (например, человека) без избыточной токсичности, раздражения, аллергических реакций или других проблем или осложнений, соизмеряя с приемлемым соотношением выгода/риска. Каждый носитель, эксципиент и т.д. также должен быть "приемлемым" в отношении совместимости с другими ингредиентами состава.

Фармацевтические композиции, содержащие композицию как здесь определено могут быть получены в соответствии с известными методами, см., например, книгу Remington's 15 Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, США.

Соответственно, в другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к композиции как здесь определено в форме фармацевтической композиции.

Фармацевтические композиции могут находиться в любой форме, подходящей для перорального, парентерального, местного, интраназального, офтальмического, ушного, 20 ректального, внутривагинального или трансдермального введения. Когда композиции предназначены для парентерального введения, они могут быть составлены для внутривенного, внутримышечного, внутрибрюшинного, подкожного введения или для 25 прямой доставки к целевому органу, или в ткань инъекцией, инфузией или другими средствами доставки. Доставка может осуществляться болюсной инъекцией, краткосрочной инфузией или длительной инфузией, и может осуществляться пассивной доставкой или с помощью подходящего инфузионного насоса.

Фармацевтические составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, сорасторовители, смеси 30 органических растворителей, агенты, образующие комплекс с циклодекстрином, эмульгирующие агенты (для образования и стабилизации эмульсионных составов), компоненты липосом для получения липосом, гелеобразующие полимеры для образования полимерных гелей, вещества, защищающие от лиофилизации и комбинации 35 агентов, например, для стабилизации активного ингредиента в растворимой форме и получения изотонического состава с кровью пациента. Фармацевтические составы для парентерального введения также могут быть получены в форме водных и неводных стерильных супензий, которые могут включать супендирующие агенты и загущающие 40 агенты (статья R.G.Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations. Pharmaceutical Research, 2004, T.21(2), cc.201-230).

Липосомы представляют собой закрытые сферические везикулы, состоящие из внешних липидных бислойных мембран и внутреннего водного ядра, и имеющие 45 внешний диаметр <100 мкм. В зависимости от уровня гидрофобности, лекарственные препараты со средней гидрофобностью могут солюбилизоваться липосомами, если лекарственный препарат инкапсулируется или встраивается в липосому. Гидрофобные лекарственные препараты также могут солюбилизоваться липосомами, если молекула лекарственного средства становится составной частью липидной бислойной мембранны, и в этом случае, гидрофобный лекарственный препарат растворяется в липидной части липидного бислоя.

Составы могут присутствовать в емкостях с одной дозой или с несколькими дозами, например, в закрытых ампулах и сосудах, и могут храниться в условиях сухого замораживания (лиофилизация), только с необходимостью добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением.

5 Фармацевтический состав может быть получен лиофилизацией соединения формулы (I). Лиофилизация относится к методике сухого замораживания композиции. Сухое замораживание и лиофилизация, следовательно, используются здесь как синонимы.

Инъекционные растворы и суспензии немедленного приготовления могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

10 Фармацевтические композиции настоящего изобретения для парентеральной инъекции также могут содержать фармацевтически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед применением. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей,

15 растворителей или связующих включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и им подобные), карбоксиметилцеллюлозу и их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло), и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Нужная текучесть может поддерживаться, например, применением покрывающих материалов, таких как лецитин, путем

20 поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий, и путем применения поверхностно-активных веществ.

Композиции настоящего изобретения также могут содержать адьюванты, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может предотвращаться включением

25 различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты, и им подобных. Также может быть необходимо включение изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и им подобные. Пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть получена включением агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как

30 моностеарат алюминия и желатин.

В одном предпочтительном варианте осуществления по изобретению, фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для внутривенного введения, например, инъекцией или инфузией. Для внутривенного введения раствор может вводиться как таковой, или может быть помещен в емкость для инфузии

35 (содержащую фармацевтически приемлемый эксципиент, такой как 0,9% соляной раствор или 5% декстрозу), перед введением.

В другом предпочтительном варианте осуществления, фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для подкожного (п/к) введения.

Фармацевтические дозированные формы, подходящие для перорального введения, 40 включают таблетки, капсулы, оболоченные таблетки, пилюли, лепешки, сиропы, растворы, порошки, гранулы, эликсиры и суспензии, сублингвальные таблетки, диски или пластиры и буккальные пластиры.

45 Так, композиции таблеток могут содержать единичные дозировки активного соединения вместе с инертным разбавителем или носителем, таким как сахар или спирт сахара, например, лактоза, сахароза, сорбит или маннит; и/или несахарный разбавитель, такой как карбонат натрия, фосфат кальция, карбонат кальция или целлюлоза или ее производное, такое как метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, и крахмалы, такие как кукурузный крахмал. Таблетки

также могут содержать такие стандартные ингредиенты, как связующие и гранулирующие агенты, такие как поливинилпирролидон, разрыхлители (например, присоединяемые поперечношитые полимеры, такие как поперечношитая

5 карбоксиметилцеллюлоза), лубриканты (например, стеараты), консерванты (например, парабены), антиоксиданты (например, ВНТ), буферы (например, фосфатные или цитратные буферы), и агенты для получения шипучих смесей, такие как смеси цитрата/бикарбоната. Такие эксципиенты также являются хорошо известными и не нуждаются в более подробном описании.

Составами капсул могут быть твердые желатиновые или мягкие желатиновые

10 капсулы, и могут содержать активный компонент в твердой, полутвердой или жидкой форме. Желатиновые капсулы могут быть получены из животного желатина или его синтетических или растительных эквивалентов.

15 Твердые дозированные формы (например, таблетки, капсулы и т.д.) могут быть оболоченными или необолоченными, но обычно имеют покрытие, например, защитное пленочное покрытие (например, воск или глазурь) или покрытие для контролируемого высвобождения. Покрытие (например, полимер типа EudragitTM) может быть разработано для высвобождения активного компонента в нужном месте желудочно-кишечного тракта. Так, покрытие может быть выбрано таким образом, чтобы оно разрушалось в определенных условиях pH в желудочно-кишечном тракте, тем самым селективно 20 высвобождая соединение в кишечнике или в подвздошной кишке или в двенадцатиперстной кишке.

25 Вместо или в дополнение к покрытию, лекарственный препарат может присутствовать в твердом носителе, содержащем контролирующий высвобождение агент, например, агент для отсроченного высвобождения, который может подходить для селективного высвобождения соединения в условиях различной кислотности или основности в желудочно-кишечном тракте. Альтернативно, материал носителя или покрытия, замедляющего высвобождение, может иметь форму растворяющегося полимера (например, полимер малеинового ангидрида), который в основном непрерывно растворяется, пока дозированная форма проходит через желудочно-кишечный тракт. 30 В качестве другой альтернативы, активное соединение может быть составлено в системе для доставки, которая обеспечивает осмотический контроль высвобождения соединения. Составы для осмотического высвобождения и другого отсроченного высвобождения или длительного высвобождения могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными специалисту в данной области техники.

35 Фармацевтические композиции содержат от около 1% до около 95%, предпочтительно от около 20% до около 90% активного ингредиента. Фармацевтические композиции в соответствии с изобретением могут находиться, например, в единичной дозированной форме, такой как в форме ампул, сосудов, суппозиториев, драже, таблеток или капсул.

40 Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть получены объединением активного ингредиента с твердыми носителями, при необходимости гранулированием полученной смеси, и обработкой смеси, при желании или необходимости, после добавления подходящих эксципиентов, с получением таблеток, ядер драже или капсул. Так же возможно для них внедрение в полимерные носители, которые позволяют осуществить диффузию или высвобождение активных ингредиентов 45 в измеренных количествах.

Композиции по изобретению также могут быть составлены в виде твердых дисперсий. Твердые дисперсии являются гомогенными очень тонко диспергированными фазами двух или более твердых веществ. Твердые растворы (молекулярно диспергированные

системы), один тип твердой дисперсии, хорошо известны для применения в фармацевтической технологии (см, статью Chiou и Riegelman, J.Pharm. Sci., 1971, 60, сс.1281-1300) и полезны для повышения скоростей растворения и повышения биодоступности лекарственных препаратов, плохо растворимых в воде.

5 Настоящее изобретение также относится к твердым дозированным формам, включающим описанный выше твердый раствор. Твердые дозированные формы включают таблетки, капсулы и жевательные таблетки. Известные эксципиенты могут быть смешаны с твердым раствором с получением нужной дозированной формы. Например, капсула может содержать твердый раствор, смешанный с (а) разрыхлителем 10 и лубрикантом, или (б) разрыхлителем, лубрикантом и поверхностно-активным веществом. Таблетка может содержать твердый раствор, смешанный по крайней мере с одним разрыхлителем, лубрикантом, поверхностно-активным веществом и глидантом. Жевательная таблетка может содержать твердый раствор, смешанный с наполнителем, лубрикантом, и при необходимости дополнительным подслащающим агентом (таким 15 как искусственный подсладитель) и подходящими отдушками.

Фармацевтические составы могут быть представлены пациенту в "упаковках для 20 пациента", содержащих полный курс лечения в одной упаковке, обычно блистерной упаковке. Упаковки для пациента обладают преимуществами над традиционными предписаниями, когда врач отделяет партию фармацевтического средства для пациента от общей партии, в том, что пациент всегда имеет доступ к вкладышу, содержащемуся в упаковке для пациента, обычно отирующему в предписании для пациента. Включение вкладыша, как было показано, улучшает восприимчивость пациента к инструкциям врача.

25 Композиции для местного применения включают мази, кремы, спреи, пластыри, гели, жидкие капли и вкладки (например, внутриглазные вкладки). Такие композиции могут быть получены в соответствии с известными способами.

Примеры составов для ректального или интравагинального введения включают пессарии и суппозитории, которые могут быть, например, получены с формируемым 30 пластичным или воскообразным материалом, содержащим активное соединение.

35 Композиции для введения путем ингаляции могут иметь форму ингалируемых порошковых композиций или жидких или порошковых спреев, и могут вводиться в стандартной форме, используя порошковые устройства для ингаляций или аэрозольные распыляющие устройства. Такие устройства являются хорошо известными. Для введения ингаляцией, порошковые составы обычно включают активное соединение вместе с инертным твердым порошковым разбавителем, таким как лактоза.

40 Композиции обычно присутствуют в единичной дозированной форме, и как таковые обычно содержат достаточное количество соединения для получения нужного уровня биологической активности. Например, состав может содержать от 1 нг до 2 г активного ингредиента, например, от 1 нг до 2 мг активного ингредиента. В этом диапазоне, конкретными поддиапазонами соединения являются от 0,1 мг до 2 г активного ингредиента (обычно от 10 мг до 1 г, например, от 50 мг до 500 мг), или от 1 мкг до 20 мг (например, от 1 мкг до 10 мг, например, от 0,1 мг до 2 мг активного ингредиента).

45 Для пероральных композиций, единичная дозированная форма может содержать от 1 мг до 2 г, обычно от 10 мг до 1 г, например, от 50 мг до 1 г, например, от 100 мг до 1 г, активного соединения.

Активное соединение вводят пациенту, нуждающемуся в этом (например, человеку или животному) в количестве, достаточном для достижения нужного терапевтического действия.

Ингибирующая активность в отношении протеинкиназы

Активность соединения формулы (I) в качестве ингибиторов протеинкиназы А и протеинкиназы В может быть измерена с помощью анализов, приведенных далее в примерах, и уровень активности, проявляемый данным соединением, может быть определен по значениям IC₅₀.

Терапевтические применения

Профилактика или лечение пролиферативных нарушений Соединение формулы (I) является ингибитором протеинкиназы А и протеинкиназы В. Как таковое, оно является полезным для получения средств для предотвращения роста или индуцирования апоптоза

10 неоплазий. Композиции по изобретению, следовательно, полезны для лечения или профилактики пролиферативных нарушений, таких как рак. В частности, опухоли с делениями или инактивирующими мутациями в PTEN или недостатком экспрессии PTEN или перегруппировками в (Т-клеточный лимфицит) TCL-1 гене могут быть особенно чувствительны к ингибиторам РКВ. Опухоли, которые имеют другие нарушения,

15 приводящие к сверхрегулируемому пути передачи сигнала РКВ, также могут быть особенно чувствительны к ингибиторам РКВ. Примеры таких нарушений включают, но не ограничиваются ими, сверхэкспрессию одной или нескольких субъединиц PI3K, сверхэкспрессию одной или нескольких изоформ РКВ, или мутации в PI3K, PDK1 или РКВ, которые приводят к повышению базальной активности рассматриваемого

20 ферментата, или сверхрегулированию или сверхэкспрессии или мутационной активации рецептора фактора роста, такого как фактор роста, выбранный из семейства рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и рецептора васкулярного эндотелиального фактора роста

25 (VEGFR).

Композиции по изобретению также полезны для лечения других состояний, которые вызваны нарушениями пролиферации или выживаемости, такими как вирусные инфекции, и, например, нейродегенеративными заболеваниями. РКВ играет важную роль в поддержании выживаемости иммунных клеток в процессе иммунного отклика, и, следовательно, ингибиторы РКВ могли бы быть особенно полезны при иммунных нарушениях, включающих аутоиммунные состояния.

Следовательно, ингибиторы РКВ могут быть полезны для лечения заболеваний, в которых имеется нарушение пролиферации, апоптоза или дифференциации.

Ингибиторы РКВ также могут быть полезны при заболеваниях, возникающих из-за инсулиновой резистентности и нечувствительности, и нарушения запасов глюкозы, энергии и жиров, такого как метаболическое заболевание и ожирение.

Примеры видов рака, которые могут ингибироваться, включают, но не ограничиваются ими, карциному, например, карциному мочевого пузыря, груди, толстой кишки (например, карциномы ободочной и прямой кишки, такая как аденокарцинома 40 толстой кишки и аденома толстой кишки), почек, эпидермиса, печени, легких, например, аденокарцинома, рак малых клеток легкого и карциномы немалых клеток легкого, пищевода, желчного пузыря, яичников, поджелудочной железы, например, внешнесекреторная карцинома поджелудочной железы, желудка, шейки матки, эндометрия, щитовидной железы, простаты или кожи, например, плоскоклеточная 45 карцинома;

гематопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, например, лейкемия, острую лимфоцитарную лейкемию, В-клеточную лимфому, множественную миелому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, лимфому не-Ходжкина, лимфому ворсинистых

клеток, или лимфому Буркитта; гематопоетическую опухоль миелоидного происхождения, например, острые и хронические миелогенные лейкемии, миелодиспластический синдром или промиелоцитарную лейкемию; миелопролиферативный синдром; тироидный фолликулярный рак; опухоль 5 мезенхимального происхождения, например, фибросаркома или рабдомиосаркома; опухоль центральной или периферийной нервной системы, например, астроцитома, нейробластома, глиома или шваннома; меланому; семиному; тератокарциному; остеосаркому; пигментную ксенодерому; кератоктантому; тироидный фолликулярный рак или саркому Капоши.

10 Так, в фармацевтических композициях, применениях или способах настоящего изобретения для лечения заболевания или состояния, включающего нарушенный клеточный рост, заболеванием или состоянием, включающим нарушенный клеточный рост, в одном варианте осуществления является рак.

15 Конкретные виды рака включают рак груди, рак яичников, рак толстой кишки, рак простаты, рак пищевода, плоскоклеточную карциному и карциномы немалых клеток легких.

Другие виды рака включают рак груди, рак яичников, рак простаты, рак эндометрия и глиому.

20 Композиции по изобретению также могут использоваться в комбинации с другими противораковыми агентами. Примеры таких комбинаций приведены далее.

Иммунные нарушения

Иммунные нарушения, в отношении которых композиции по изобретению могут быть полезны, включают, но не ограничиваются ими, аутоиммунные состояния и хронические воспалительные заболевания, например, системная красная волчанка, 25 аутоиммунный гломерулонефрит, ревматоидный артрит, псориаз, воспалительное кишечное заболевание и аутоиммунный сахарный диабет, экзематозные гиперчувствительные реакции, астму, СОПД, ринит и заболевание верхних дыхательных путей.

Другие терапевтические применения

30 РКВ играет роль в апоптозе, пролиферации, дифференциации, и, следовательно, соединение формулы (I) также может быть полезным для лечения следующих заболеваний, отличных от рака и заболеваний, связанных с иммунной дисфункцией; вирусных инфекций, например, вирус герпеса, поксвирус, вирус Эпштейна-Барре, вирус Синдбиса, аденоовирус, ВИЧ, НРВ, ВГС и НСМВ; профилактики СПИДа у пациентов, 35 инфицированных ВИЧ; сердечнососудистых заболеваний, например, сердечная гипертрофия, рестеноз, атеросклероз; нейродегенеративных нарушений, например, болезнь Альцгеймера, связанное со СПИДом слабоумие, болезнь Паркинсона, амиотрофический латеральный склероз, пигментная дегенерация сетчатки, атрофия остистой мышцы и мозжечковая дегенерация; гломерулонефрит; миелодиспластические 40 синдромы, инфаркт миокарда, связанный с ишемической травмой, инсульт и реперфузионная травма, дегенеративные заболевания скелетно-мышечной системы, например, остеопороз и артрит, чувствительный к инсулину риносинусит, циститный фиброз, рассеянный склероз, почечные заболевания.

45 Применения, связанные или возникающие благодаря ингибирующей активности в отношении киназы ROCK

Соединения формулы (I) модулируют (например, ингибируют) активность киназы ROCK. Соединения, следовательно, находят применение для: (а) лечения или профилактики заболевания или состояния, при котором показано модулирование

(например, ингибирование) киназы ROCK; и/или (б) лечения субъекта или пациента, для которого показано модулирование (например, ингибирование) киназы ROCK; и/или (в) лечения или профилактики заболевания или состояния, при котором показано модулирование (например, ингибирование) пути передачи сигнала Rho; и/или (г) лечения субъекта или пациента, для которого показано модулирование (например, ингибирование) пути передачи сигнала Rho.

Настоящее изобретение, следовательно, находит применение в отношении заболеваний и состояний, выбранных из: (а) опухолевого метастаза; (б) опухолевой инвазии; (в) опухолевой прогрессии; (г) опухолевой адгезии (например, адгезия опухолевой клетки); (д) опухолевого метастаза, инвазии или прогрессии, зависимых от сократимости актономицина; (е) клеточной трансформации; (ж) ROCK-опосредованного опухолевого метастаза, инвазии, прогрессии или адгезии; (з) ROCK-опосредованных опухолевого метастаза, инвазии или прогрессии, зависимых от сократимости актономицина; (и) ROCK-опосредованной клеточной трансформации.

Настоящее изобретение также находит применение в отношении рака (например, ROCK-опосредованного рака), особенно когда рак (например, ROCK-опосредованный рак) выбран из: (а) тестикулярных эмбриональных опухолей;

(б) малых карцином груди с метастатической способностью; (в) рака мочевого пузыря; (г) рака яичников; (д) рака простаты и (е) гепатоклеточной карциномы.

Другие заболевания и состояния включают инвазию, метастаз и опухолевую прогрессию любого из указанных здесь видов рака.

Настоящее изобретение также находит применение в отношении сердечнососудистых заболеваний или состояний, особенно выбранных из: (а) гипертензии; (б) сердечной дисфункции (например, хронической и застойной сердечной недостаточности); (в) гипертрофии сердца; (г) рестеноза; (д) почечной дисфункции (например, хронической почечной недостаточности); (е) атеросклероза (артериосклероза); (ж) кардиозащиты; (з) приживаемости трансплантата; (и) церебральной ишемии; (к) коронарного вазоспазма и (л) васкулярного воспаления.

Другие приемлемые заболевания и состояния включают мышечную (например, гладкой мышцы) дисфункцию, например, выбранную из: (а) астмы; (б) эректильной дисфункции полового органа; (в) половой дисфункции у женщин; (г) синдрома сверхактивного мочевого пузыря I и (д) нарушения гладкой мышцы (например, связанного с гипертензией).

Другие приемлемые заболевания и состояния включают воспаление, где, например, воспаление включает или проявляется в: (а) ревматоидном артрите; (б) синдроме раздраженного кишечника; (в) воспалительном кишечном заболевании; (г) васкулярном воспалении и (д) нейровоспалительном заболевании или состоянии.

В вариантах осуществления, связанных с нейровоспалительными заболеваниями или состояниями, они могут быть выбраны из: (а) инсульта; (б) рассеянного склероза; (в) болезни Альцгеймера; (г) болезни Паркинсона; (д) амиотрофического латерального склероза и (е) воспалительной боли.

Другие приемлемые заболевания и состояния включают заболевания или состояния ЦНС, включая заболевания или состояния, выбранные из: (а) повреждения или травмы спинного мозга; (б) повреждения или травмы головного мозга; (в) острой неврональной травмы (например, инсульт или травматическое повреждение головного мозга); (г) болезни Паркинсона; (д) болезни Альцгеймера; (е) нейродегенеративных состояний или заболеваний; (ж) инсульта (например, связанного с гипертензией); (з) церебрального вазоспазма; (и) ингибирования роста и распространения нейрита; (к) ингибиранной

регенерации нейрита; (л) отягощенного посттравматического функционального восстановления; (м) демиелинизирующих заболеваний или нарушений; (н) воспалительных заболеваний или нарушений ЦНС; (о) невропатической боли и (п) нейродегенерации.

- 5 Другие приемлемые заболевания или состояния ЦНС включают заболевания или состояния, выбранные из: синдрома Дауна и β -амилоидной ангиопатии, такой как, но не ограничиваясь ею, церебральная амилоидная ангиопатия, наследственного геморрагического инсульта, нарушений, связанных с когнитивным нарушением, таким как, но не ограничиваясь им МСИ ("умеренное когнитивное нарушение"), болезни Альцгеймера, потери памяти, симптомов дефицита внимания, связанных с болезнью Альцгеймера, нейродегенерации, связанной с заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера или слабоумие, включая слабоумие смешанного вакулярного и дегенеративного происхождения, предстарческого слабоумия, старческого слабоумия и слабоумия, связанного с болезнью Паркинсона, прогрессирующими супрануклеарным параличом или кортикальной базальной дегенерацией, болезни Паркинсона, лобно-височного слабоумия типа Паркинсона, комплексного слабоумия Паркинсона Гуама, слабоумия при ВИЧ, заболеваний, связанных с патологиями нейрофибриллярных клубков, слабоумия *pugilistica*, амиотрофического латерального склероза, кортико базальной дегенерации, синдрома Дауна, болезни Хантингтона,
- 10 20 постэнцефалитического паркинсонизма, прогрессирующего супрануклеарного паралича, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика, инсульта, травмы головы и других хронических нейродегенеративных заболеваний, биполярного заболевания, аффективных нарушений, депрессии, беспокойства, шизофрении, когнитивных нарушений, потери волос, применения контрацептивов, состояний перед слабоумием, возрастного ухудшения
- 15 25 памяти, возрастного когнитивного ухудшения, когнитивного ухудшения без слабоумия, умеренного когнитивного ухудшения, умеренного нейрокогнитивного ухудшения, зрелого беспамятства, ухудшения памяти и когнитивного поведения, вакулярного слабоумия, слабоумия с тельцами Льюиса, лобно-височного слабоумия и андрогенного облысения.
- 30 Другие приемлемые заболевания и состояния включают: (а) инсулиновую резистентность; (б) защиту трансплантата (например, сердечнососудистую или воспалительную защиту трансплантата); (в) диабеты; (г) астму; (д) легочный ангиоспазм; (е) глаукому и (ж) фиброзы (например, фиброз печени и фиброз почек).

- 35 Другие приемлемые заболевания и состояния включают инфекционные заболевания или состояния, включающие метазойные, протозойные, грибковые, прионовые, вирусные или бактериальные заражения, заболевания или инфекции.

В таких вариантах осуществления, инфекционное заболевание или состояние может включать опосредованную патогеном цитоскелетную перегруппировку.

- Пролиферативные нарушения (включая рак): Настоящее изобретение также находит применение в качестве средств для предотвращения роста или индуцирования апоптоза неоплазий. Следовательно, предполагается, что настоящее изобретение будет полезным для лечения или профилактики пролиферативных нарушений, таких как рак. Примеры таких нарушений включают, но не ограничиваются ими, сверхэкспрессию одного или нескольких членов путем передачи сигнала Rho, или мутации указанных членов, которые приводят к повышению базальной активности киназы(киназ) ROCK или передачи сигнала Rho (которое, например, может быть связано со сверхрегулированием или сверхэкспрессией или мутационной активацией рецептора фактора роста, такого как фактор роста, выбранный из семейств рецептора эпидермального фактора роста (EGFR),

рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), рецептора тромбоуитарного фактора роста (PDGFR), рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и рецептора васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGFR)).

Также предполагается, что изобретение является полезным для лечения других

5 состояний, которые являются результатом нарушений в пролиферации или выживаемости, таких как, например, вирусные инфекции и нейродегенеративные заболевания.

10 Настоящее изобретение, следовательно, находит широкое применение для лечения заболеваний, в которых присутствует нарушение пролиферации, апоптоза или дифференциации.

Примеры видов рака, которые могут ингибироваться, включают, но не ограничиваются ими, карциному, например, карциному мочевого пузыря, груди, толстой кишки (например, карциномы ободочной и прямой кишки, такая как аденокарцинома толстой кишки и аденома толстой кишки), почек, эпидермиса, печени, легких, например, 15 аденокарцинома, рак малых клеток легкого и карциномы немалых клеток легкого, пищевода, желчного пузыря, яичников, поджелудочной железы, например, внешнесекреторная карцинома поджелудочной железы, желудка, шейки матки, эндометрия, щитовидной железы, простаты или кожи, например, плоскоклеточная карцинома; гематopoэтические опухоли лимфоидного происхождения, например, 20 лейкемия, острая лимфоцитарная лейкемия, В-клеточную лимфому, множественную миелому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, лимфому не-Ходжкина, лимфому ворсистых клеток, или лимфому Буркитта; гематopoэтическую опухоль миелоидного происхождения, например, острые и хронические миелогенные лейкемии, миелодиспластический синдром или промиелоцитарную лейкемию; 25 миелопролиферативный синдром; тироидный фолликулярный рак; опухоль мезенхимального происхождения, например, фиброзаркома или рабдомиосаркома; опухоль центральной или периферийной нервной системы, например, астроцитома, нейробластома, глиома или шваннома; меланому; семиному; тератокарциному; остеосаркому; пигментную ксенодерому; кератоктантому; тироидный фолликулярный 30 рак или саркому Капоши.

Другим примером гематopoэтической опухоли лимфоидного происхождения является множественная миелома.

Конкретные виды рака включают рак груди, рак яичников, рак толстой кишки, рак простаты, рак пищевода, плоскоклеточную карциному и карциномы немалых клеток 35 легких. Другие виды рака включают рак груди, рак яичников, рак простаты, рак эндометрия и глиому.

Другим примером нарушения пролиферации является миелопролиферативный синдром.

Иммунные нарушения: Иммунные нарушения, в отношении которых изобретение 40 может быть полезно, включают, но не ограничиваются ими, аутоиммунные состояния и хронические воспалительные заболевания, например, системная красная волчанка, аутоиммунный гломерулонефрит, ревматоидный артрит, псориаз, воспалительное кишечное заболевание и аутоиммунный сахарный диабет, экзематозные гиперчувствительные реакции, астму, COPD, ринит и заболевание верхних дыхательных 45 путей.

Другие терапевтические применения: Опосредованные ROCK физиологические процессы играют роль в апоптозе, пролиферации, дифференциации, и, следовательно, изобретение также может быть полезным для лечения следующих заболеваний, отличных

- от рака и заболеваний, связанных с иммунной дисфункцией; вирусных инфекций, например, вирус герпеса, поксивирус, вирус Эпштейна-Барре, вирус Синдбиса, аденоовирус, ВИЧ, HPV, ВГС и НСМВ; профилактики СПИДа у пациентов, инфицированных ВИЧ; сердечнососудистых заболеваний, например, сердечная 5 гипертрофия, рестеноз, атеросклероз; нейродегенеративных нарушений, например, болезнь Альцгеймера, связанное со СПИДом слабоумие, болезнь Паркинсона, амиотрофический латеральный склероз, пигментная дегенерация сетчатки, атрофия остистой мышцы и мозжечковая дегенерация; гломерулонефрит; миелодиспластические синдромы, инфаркт миокарда, связанный с ишемической травмой, инсульт и 10 реперфузионная травма, дегенеративные заболевания скелетно-мышечной системы, например, остеопороз и артрит, чувствительный к инсулину риносинусит, циститный 15 фиброз, рассеянный склероз, почечные заболевания.

Настоящее изобретение также может быть полезно при заболеваниях, возникающих из-за инсулиновой резистентности и нечувствительности, и нарушения запасов глюкозы, 15 энергии и жиров, такого как метаболическое заболевание и ожирение.

Настоящее изобретение предполагает ROCK-опосредованное внедрение, лечение или профилактику любого вида. Так, настоящее изобретение находит применение в отношении лечения или профилактики, включающих: (а) модулирование (например, ингибиование) киназы ROCK; или (б) внедрение на уровень активности киназы ROCK; 20 или (в) внедрение на уровень пути передачи сигнала Rho (например, на уровень RhoA и/или RhoC).

Другие применяемые способы включают внедрения, которые приводят к: (а) мышечной (например, гладкой мышцы) релаксации; (б) вакулярной мышечной 25 релаксации (например, для повышения подвижности сосудов крови); (в) модулированию нервных клеток; (г) снижению клеточной пролиферации; (д) снижению клеточной миграции; (е) подавлению цитоскелетной перегруппировки при патогенной инвазии 30 или инфекции; (ж) ускорению регенерации тканей и (з) повышению посттравматического функционального восстановления.

В таких вариантах осуществления, модулирование нервных клеток может включать: 35 (а) неврональную регенерацию; (б) индуцирование роста новых аксонов; (в) аксонный рост в повреждениях ЦНС; (г) внешний рост нейрита; (д) дифференциацию нейрита; (е) рост аксона; (ж) образование дендритического ядра; (з) поддержание дендритического ядра; (и) модулирование разрушения конуса роста нейрита и (к) модулирование ингибиования внешнего роста нейрита.

Другие приемлемые способы лечения включают трансплантационную терапию (например, включающую защиту трансплантата).

Другие приемлемые способы включают способ диагностики и лечения заболевания или состояния, который включает (i) скрининг пациента на определение того, является ли заболевание или состояние, которое имеется у пациента или которому он может 40 быть подвержен, тем заболеванием или состоянием, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении киназы ROCK; и (ii) когда показано, что заболевание или состояние пациента поддается такому лечению, тогда введение пациенту соединения в соответствии с настоящим изобретением.

Субъект или пациент может быть выбран из: (а) субъекта и пациента, у которого 45 нарушен функция киназы ROCK (например, гиперактивность); и (б) субъекта и пациента, который подвергался диагностическим тестированиям на дисфункцию ROCK (например, на гиперактивность ROCK); (в) субъекта и пациента, у которого нарушены пути передачи сигнала Rho; и (г) субъекта и пациента, который подвергался

диагностическим тестированиям на дисфункцию путей передачи сигнала Rho.

Применения, связанные или возникающие вследствие ингибирующей активности в отношении киназы p70S6K

Соединения формулы (I) модулируют (например, ингибируют) активность

5 протеинкиназы p70S6K. Следовательно, соединения находят применение при: (а) лечении или профилактике заболевания или состояния, при котором показано модулирование (например, ингибирование) протеинкиназы p70S6K; и/или (б) лечении субъекта или пациента, для которого показано модулирование (например, ингибирование) протеинкиназы p70S6K.

10 Настоящее изобретение, следовательно, находит применение в отношении состояний, выбранных из: (а) рака (например, p70S6K-опосредованный рак); (б) опухолевого метастаза; (в) иммунной дисфункции; (г) повреждения ткани (например, после воспаления); (д) амплификации хромосомы 17q23 (или состояний, возникающих или связанных с ней); (е) полипоза кишечника типа II (или состояний, возникающих или 15 связанных с ним); (ж) мутации (мутаций) LKB1 (или состояний, возникающих или связанных с ней); (з) мутации (мутаций) BRCA1 (или состояний, возникающих или связанных с ней); (и) мутации (мутаций) BRCA2 (или состояний, возникающих или связанных с ней); (к) нарушенных апоптозных программ; (л) сигнальной трансдукции, сверхэкспрессии и активации рецептора фактора роста в опухолевой ткани; (м) 20 метаболического заболевания или нарушения; (н) нарушений, связанных с нарушенной клеточной пролиферацией и/или метаболизмом; и (о) нейронных нарушений.

В таких вариантах осуществления, заболевание или состояние, возникающее или связанное с амплификацией хромосомы 17q23, может быть выбрано из: (а) первичных опухолей груди; (б) опухолей (например, опухолей груди), содержащих мутации BRCA2; 25 (в) опухолей (например, опухолей груди), содержащих мутации BRCA1; (г) опухолей поджелудочной железы; (д) опухолей мочевого пузыря и (е) нейробластом.

Заболеванием или состоянием, возникающим или связанным с мутацией (мутациями) LKB1, может быть легочная аденокарцинома, содержащая мутацию (мутации) LKB1 (например, инактивирующую мутацию (мутации) LKB1).

30 Заболеванием или состоянием, возникающим или связанным с мутацией (мутациями), может быть рак груди.

Метаболическое заболевание или нарушение может быть выбрано из: (а) ожирения (например, возрастного ожирения или ожирения, вызванного питанием); (б) диабета; (в) метаболического синдрома; (г) инсулиновой резистентности; (д) гипергликемии; (е) 35 гипераминоацидемии и (ж) гиперлипидемии.

Пролиферативные нарушения (включая рак): Настоящее изобретение также находит применение в качестве средства для предотвращения роста или индуцирования апоптоза неоплазий. Следовательно, предполагается, что изобретение будет полезным для лечения или профилактики пролиферативных нарушений, таких как рак. Примеры таких 40 нарушений включают, но не ограничиваются ими, сверхэкспрессию p70S6K (или другие описанные здесь синдромы).

Также предполагается, что изобретение полезно для лечения других состояний, которые возникают из-за нарушений пролиферации или выживаемости, таких как, например, вирусные инфекции и нейродегенеративные заболевания.

45 Настоящее изобретение, следовательно, находит широкое применение при лечении заболеваний, в которых присутствует нарушение пролиферации, апоптоза или дифференциации.

Примеры видов рака, которые могут ингибироваться, включают, но не

ограничиваются ими, карциному, например, карциному мочевого пузыря, груди, толстой кишки (например, карциномы ободочной и прямой кишки, такая как adenокарцинома толстой кишки и adenoma толстой кишки), почек, эпидермиса, печени, легких, например, adenокарцинома, рак малых клеток легкого и карциномы немалых клеток легкого,

- 5 пищевода, желчного пузыря, яичников, поджелудочной железы, например, внешнесекреторная карцинома поджелудочной железы, желудка, шейки матки, эндометрия, щитовидной железы, простаты или кожи, например, плоскоклеточная карцинома;

- гематопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, например, лейкемия,
10 оструя лимфоцитарная лейкемия, В-клеточную лимфому, множественную миелому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, лимфому не-Ходжкина, лимфому ворсистых клеток, или лимфому Буркитта; гематопоэтическую опухоль миелоидного происхождения, например, острые и хронические миелогенные лейкемии, миелодиспластический синдром или промиелоцитарную лейкемию;
15 миелопролиферативный синдром; тироидный фолликулярный рак; опухоль мезенхимального происхождения, например, фибросаркома или рабдомиосаркома; опухоль центральной или периферийной нервной системы, например, астроцитома, нейробластома, глиома или шваннома; меланому; семиному; тератокарциному; остеосаркому; пигментную ксенодерому; кератоктантому; тироидный фолликулярный рак или саркому Капоши.

Другим примером гематопоэтической опухоли лимфоидного происхождения является множественная миелома.

- Конкретные виды рака включают рак груди, рак яичников, рак толстой кишки, рак простаты, рак пищевода, плоскоклеточную карциному и карциномы немалых клеток легких. Другие виды рака включают рак груди, рак яичников, рак простаты, рак эндометрия и глиому.

Другим примером нарушения пролиферации является миелопролиферативный синдром.

- Иммунные нарушения: Иммунные нарушения, в отношении которых изобретение может быть полезно, включают, но не ограничиваются ими, аутоиммунные состояния и хронические воспалительные заболевания, например, системная красная волчанка, аутоиммунный гломерулонефрит, ревматоидный артрит, псориаз, воспалительное кишечное заболевание и аутоиммунный сахарный диабет, экзематозные гиперчувствительные реакции, астму, COPD, ринит и заболевание верхних дыхательных путей.

- Другие терапевтические применения: Опосредованные p70S6K физиологические процессы играют роль в апоптозе, пролиферации, дифференциации, и, следовательно, изобретение также может быть полезным для лечения следующих заболеваний, отличных от рака и заболеваний, связанных с иммунной дисфункцией; вирусных инфекций, например, вирус герпеса, поксивирус, вирус Эпштейна-Барре, вирус Синдбиса, adenovirus, ВИЧ, HPV, ВГС и HCMV; профилактики СПИДа у пациентов, инфицированных ВИЧ; сердечнососудистых заболеваний, например, сердечная гипертрофия, рестеноз, атеросклероз; нейродегенеративных нарушений, например, болезнь Альцгеймера, связанное со СПИДом слабоумие, болезнь Паркинсона, амиотрофический латеральный склероз, пигментная дегенерация сетчатки, атрофия остистой мышцы и мозжечковая дегенерация; гломерулонефрит; миелодиспластические синдромы, инфаркт миокарда, связанный с ишемической травмой, инсульт и реперфузионная травма, дегенеративные заболевания скелетно-мышечной системы,

например, остеопороз и артрит, чувствительный к инсулину риносинусит, циститный фиброз, рассеянный склероз, почечные заболевания.

Настоящее изобретение также может быть полезно при заболеваниях, возникающих из-за инсулиновой резистентности и нечувствительности, и нарушения запасов глюкозы, энергии и жиров, такого как метаболическое заболевание и ожирение.

Настоящее изобретение предполагает p70S6K-опосредованное внедрение, лечение или профилактику любого вида. Так, настоящее изобретение находит применение в отношении лечения или профилактики, включающих: (а) модулирование (например, ингибирование) протеинкиназы p70S6K; (б) внедрение на уровне активности

- 10 протеинкиназы p70S6K; (б) ингибирование прогрессии от G1 до S фазы клеточного цикла *in vivo*; (в) ингибирование пролиферации клеточного цикла от G1 до S фазы клеточного цикла; (г) применение соединения формулы (I) в качестве заместителя рапамицина; (д) применение соединения формулы (I) в качестве заместителя вортманина; (е) переустановление подходящих апоптозных программ; (ж)
- 15 ингибирование передачи сигнала, сверхэкспрессии и активации рецептора фактора роста в опухолевой ткани; (з) модулирование нейронной клеточной дифференциации; (и) модулирование клеточной подвижности; (к) модулирование клеточного отклика (откликов) и (л) повышение чувствительности к инсулину.

Лечение или профилактика также может включать способ диагностики и лечения заболевания или состояния, который включает: (и) скрининг пациента на определение того, является ли заболевание или состояние, которое имеется у пациента или которому он может быть подвержен, тем заболеванием или состоянием, которое может излечиваться соединением, обладающим активностью в отношении протеинкиназы p70S6K; и (И) когда показано, что заболевание или состояние пациента поддается такому лечению, тогда введение пациенту соединения в соответствии с настоящим изобретением.

Субъект или пациент может быть выбран из: (а) субъекта и пациента, у которого нарушена функция протеинкиназы p70S6K (например, гиперактивность); и (б) субъекта и пациента, который подвергался диагностическим тестированиям на дисфункцию p70S6K (например, на гиперактивность p70S6K); (в) субъекта и пациента, у которого амплифицирована хромосома 17q23; и (г) субъекта и пациента, который подвергался диагностическим тестам на амплификацию хромосомы 17q23; (д) субъекта и пациента, у которого присутствует мутация (мутации) BRCA1; (е) субъекта и пациента, который подвергался диагностическим тестам на мутацию (мутации) BRCA1; (ж) субъекта и пациента, у которого присутствует мутация (мутации) BRCA2; (з) субъекта и пациента, который подвергался диагностическим тестам на мутацию (мутации) BRCA2; (и) субъекта и пациента, у которого присутствует мутация (мутации) LKB1; (к) субъекта и пациента, который подвергался диагностическим тестам на мутацию (мутации) LKB1; и (л) субъекта и пациента, который подвергался скринингу как здесь определено.

40 Преимущества композиций по изобретению

Очевидно, композиции по изобретению обладают физико-химическими свойствами, подходящими для перорального применения.

Композиция как здесь определено проявляет улучшенную пероральную биодоступность по сравнению с известными соединениями. Пероральная биодоступность может определяться как соотношение (F) воздействия на плазму соединения при введении пероральным способом к воздействию на плазму соединения при введении внутривенным (вв) способом, выражаясь в процентах.

Композиции, имеющие пероральную биодоступность (значение F) больше 30%,

наиболее предпочтительно больше 40%, особенно полезны тем, что они могут вводиться перорально, преимущественно или также как парентеральным введением.

Кроме того, соединение формулы (I) является более активным и более селективным по активности в отношении различных киназ, и демонстрируют повышенную

5 селективность и силу в отношении, в частности, РКВ.

Соединение формулы (I) является существенно более активным, чем его R-энантиомер, при ингибировании РКВ *in vitro* и в клетках. Значение IC₅₀ соединения формулы (I) в отношении выделенного фермента РКВ в радиометрическом анализе *in vitro* составляет 0,01 мкМ по сравнению с 0,96 мкМ для R-энантиомера. Это примерно 100-кратное

10 различие в активности также наблюдается в клеточном механистическом анализе, которые позволяет измерить фосфорилирование GSK3β, прямой последующий субстрат РКВ. Соединение формулы (I) проявляет значение IC₅₀ 1,1 мкМ, по сравнению со

значение для R-энантиомера >50 мкМ.

Дополнительное различие 2 энантиомеров заключается в их активности в отношении 15 близко связанный киназы РКА, когда соединение формулы (I) ингибирует выделенный фермент на 44% при 0,03 мкМ по сравнению с R-энантиомером, который ингибирует РКА при 0,25 мкМ.

Соединение формулы (I) является предпочтительным по сравнению с другими 20 соединениями, известными из предшествующего уровня техники, благодаря различиям в чувствительности к ферменту P450 и благодаря тому, что они проявляют улучшенные свойства в отношении метаболизма лекарственного препарата и фармакокинетических свойств. Например, соединение формулы (I) имеет значения IC₅₀ более 10 мкМ в отношении каждого из ферментов цитохрома P450 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 и 2D6.

25 Кроме того, соединение формулы (I) требует пониженной дозировки.

Соединение формулы (I) потенциально менее токсично по сравнению с соединениями, известными из предшествующего уровня техники.

hERG

В конце 1990-х годов ряд лекарственных препаратов, одобренных US FDA, был изъят из продажи в США, когда было обнаружено, что они связаны со смертельными 30 исходами, вызванными остановкой сердца. Позднее было обнаружено, что побочным действием этих лекарственных препаратов являлось развитие аритмий, вызванных блокированием каналов hERG в клетках сердца. Канал hERG принадлежит к семейству калиевых ионных каналов, первый член которого был обнаружен в конце 1980-х годов в мутантной дрозофиле *Drosophila melanogaster* (см. статью Jan, L.Y. и Jan, Y.N., *Nature*, 1990, A Superfamily of Ion Channels. 345, 6277, c.672). Биофизические свойства калиевого 35 ионного канала hERG описаны в статьях Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. и Keating, M.T., *Cell*, 1995, A Mechanistic Link Between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG encodes the Ikr potassium channel. 81, cc.299-307, и Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B. и Robertson, G.A., *Science*, 1995, HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-40 Gated Potassium Channel Family, 269, cc.92-95.

Устранение блокирующей активности hERG сохраняет большое значение в разработке любых новых лекарственных препаратов.

Соединения формулы (I) имеют незначительную блокирующую активность в отношении ионного канала hERG.

45 Способы лечения

Композиция как здесь определено является полезной для профилактики или лечения ряда заболеваний или состояний, опосредованных протеинкиназой А и/или протеинкиназой В и/или киназой ROCK и/или киназой p70S6K. Примеры таких

заболеваний и состояний приведены выше.

Композиции обычно вводят пациенту, нуждающемуся в таком введении, например, человеку или животному, предпочтительно человеку.

Композицию обычно вводят в количествах, которые являются терапевтически или 5 профилактически полезными, и которые обычно являются нетоксичными. Однако в некоторых ситуациях (например, в случае угрожающих жизни заболеваний), польза введения композиции как здесь определено может превалировать над вредом от любых токсических эффектов или побочных эффектов, в этом случае может быть желательным введение соединений в количествах, которые связаны со степенью токсичности.

10 Композиции могут вводиться в течение длительного периода времени для поддержания благоприятных терапевтических эффектов, или могут вводиться только в течение короткого периода времени. Альтернативно, они могут вводиться в пульсирующем или непрерывном режиме.

Обычно суточная дозировка соединения формулы (I) находится в диапазоне от 100 15 нг до 100 мг на кг веса тела, обычно от 5 нг до 25 мг на кг веса тела, и обычно от 10 нг до 15 мг на кг (например, от 10 нг до 10 мг, и обычно от 1 мкг на кг до 20 мг на кг, например, от 1 мкг до 10 мг на кг) на кг веса тела, хотя при необходимости могут вводиться более высокие или низкие дозы. Композиция как здесь определено может вводиться суточно или в повторяющемся режиме, например, каждые 2, или 3, или 4, 20 или 5, или 6, или 7, или 10 или 14, или 21, или 28 дней.

Соединение формулы (I) может вводиться перорально в диапазоне дозировок, например, от 1 до 1500 мг, от 2 до 800 мг, или от 5 до 500 мг, например, от 2 до 200 мг или от 10 до 1000 мг, в частности примеры дозировок, включая 10, 20, 50 и 80 мг.

Соединение может вводиться один раз в день или более одного раза в день. Соединение 25 может вводиться непрерывно (то есть каждый день без нарушения продолжительности режима лечения). Альтернативно, соединение может вводиться периодически, то есть вводить непрерывно в течение данного периода, такого как неделя, затем прекратить в течение периода, такого как неделя, и затем вводить непрерывно в течение другого периода, такого как неделя, и так далее, в течение режима лечения. Примеры режимов 30 лечения, включающих периодическое введение, включают режимы, где введение осуществляют циклами по одной неделе введения, одной неделе перерыва; или по две недели введения, одной неделе перерыва; или по три недели введения, одной неделе перерыва; или по две недели введения, две недели перерыва; или по четыре недели введения и две недели перерыва; или по одной неделе введения и три недели перерыва 35 - в течение одного или нескольких циклов, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более циклов.

В одной конкретной схеме дозировки пациенту вводят инфузию композиции как здесь определено в течение периодов от одного часа в сутки вплоть до десяти суток, в частности, вплоть до пяти суток в течение одной недели, и лечение повторяют с нужным 40 интервалом, таким как от двух до четырех недель, в частности, каждые три недели.

Более конкретно, пациенту можно вводить инфузию композиции как здесь определено в течение одного часа в сутки в течение 5 суток, и лечение повторять каждые три недели.

В другой конкретной схеме дозировки, пациенту вводят инфузию в течение периода от 30 минут до 1 часа, затем поддерживая инфузии различной длительности, например, 45 от 1 до 5 часов, например, 3 часа.

В другой конкретной схеме дозировки, пациенту вводят непрерывную инфузию в течение периода от 12 часов до 5 суток, в частности, непрерывную инфузию в течение периода от 24 часов до 72 часов.

Наконец, однако, вводимое количество соединения и используемый тип композиции должны соответствовать природе излечиваемого заболевания или физиологического состояния, и должны выбираться врачом.

Соединение формулы (I) может вводиться в качестве отдельного терапевтического

5 агента, или оно может вводиться в комбинированной терапии с с одним из нескольких других соединений для лечения конкретного заболевания, например, неопластического заболевания, такого как рак, как определено выше. Примеры других терапевтических агентов или терапевтических средств, которые могут вводиться вместе (совместно или в различные временные интервалы) с соединениями формулы (I), включают, но не

10 ограничиваются ими:

- ингибиторы топоизомеразы I;
- антиметаболиты;
- агенты, связывающие тубулин;
- ДНК-связывающие и ингибиторы топоизомеразы II;
- 15 - алкилирующие агенты;
- моноклональные антитела;
- антигормоны;
- ингибиторы передачи сигнала;
- ингибиторы протеасомы;
- 20 - ДНК-метилтрансферазы;
- цитокины и ретиноиды;
- лекарственные средства, связывающие хроматин;
- радиотерапия и
- другие терапевтические или профилактические агенты; например, агенты, которые
- 25 снижают или облегчают некоторые из побочных эффектов, связанные с химиотерапией. Конкретные примеры таких агентов включают противорвотные агенты и агенты, которые предотвращают или снижают длительность нейтропении, связанной с химиотерапией, и предотвращают осложнения, которые возникают из-за пониженных уровней красных кровяных телец или белых кровяных телец, например, эритропоэтин
- 30 (EPO), гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и гранулоцит-колониестимулирующий фактор (G-CSF). Также включены агенты, которые ингибируют резорбцию кости, такие как бисфосфонатные агенты, например, золедронат, памидронат и ибандронат, агенты, которые подавляют воспалительные реакции (такие как дексаметазон, преднизон и преднизолон), и агенты, используемые для снижения уровней
- 35 гормона роста в крови и IGF-I у пациентов с акромегалией, такие как синтетические формы гормона головного мозга соматостатина, которые включают ацетат октреотида, который представляет собой октапептид длительного действия с фармакологическими свойствами, повторяющими свойства природного гормона соматостатина. Также включены агенты, такие как лейковорин, который используется в качестве антидота
- 40 к лекарственным препаратам, которые снижают уровни фолевой кислоты, или сам лейковорин и агенты, такие как ацетат мегестрола, который может использоваться для лечения побочных эффектов, включая отеки и тромбэмбolicеские реакции.

Каждое из соединений, присутствующее в комбинациях по изобретению, может вводиться в отдельных изменяющихся схемах дозировок и различными способами.

45 Когда соединение формулы (I) вводят в комбинированной терапии с одним, двумя, тремя, четырьмя или более другими терапевтическими агентами (предпочтительно одним или двумя, более предпочтительно одним), соединения могут вводиться одновременно или последовательно. При введении последовательно, они могут

вводиться в близких временных интервалах (например, в течение периода 5-10 минут) или с более длительными интервалами (например, 1, 2, 3, 4 или более часа спустя, или, при необходимости, еще больше), причем точный режим дозировки соотносится со свойствами терапевтического агента (агентов).

5 Соединение формулы (I) также может вводиться вместе с нехимиотерапевтическими способами лечения, такими как радиотерапия, фотодинамическая терапия, генная терапия; хирургия и контролируемые диеты.

Для применения в комбинированной терапии с другим химиотерапевтическим агентом, композиция как здесь определено и один, два, три, четыре или более других 10 терапевтических агентов, например, могут быть составлены вместе в дозированной форме, содержащей два, три, четыре или более терапевтических агента. Альтернативно, индивидуальные терапевтические агенты могут вводиться отдельно и присутствовать вместе в форме набора, необязательно с инструкциями по их применению.

Специалисту в данной области техники известны из общего уровня техники режимы 15 дозировок и комбинированные терапии для применения.

Способы диагностики

До введения композиции как здесь определено, пациента можно исследовать для 20 определения того, является ли заболевание или состояние, которым страдает или может страдать пациент, тем заболеванием или состоянием, которое восприимчиво к лечению соединением, обладающим активностью в отношении конкретной целевой киназы (например, протеинкиназа А и/или протеинкиназа В и/или киназа ROCK и/или киназа P70S6K).

Например, биологический образец, взятый у пациента, может анализироваться на 25 определение того, является ли состояние или заболевание, такое как рак, которым страдает или может страдать пациент, тем заболеванием или состоянием, которое характеризуется генетическим нарушением или нарушенной экспрессией белка, что приводит к сверхрегулированию РКА и/или РКВ или к активации пути к нормальной 30 активности РКА и/или РКВ, или к сверхрегулированию последующего компонента пути передачи сигнала РКА и/или РКВ, такого как, в случае РКВ, Р13К, рецептор GF и PDK 1 & 2.

Альтернативно, биологический образец, взятый у пациента, может анализироваться на недостаток негативного регулятора или супрессора пути РКВ, такого как PTEN. В 35 настоящем контексте, термин "недостаток" включает расщепление гена, кодирующего регулятор или супрессор, усечение гена (например, мутацию), усечение транскрибированного продукта гена или инактивацию транскрибуемого продукта (например, точечной мутацией) или изъятие другим генным продуктом.

Альтернативно или дополнительно, пациента можно обследовать на дисфункцию 40 активности ROCK (например, повышенная или сверхрегулируемая экспрессия ROCK, мутации генов ROCK или регулирующих элементов генов ROCK) или дисфункцию передачи сигнала Rho (как здесь описано).

Термин сверхрегулирование включает повышенную экспрессию или сверхэкспрессию, 45 включая амплификацию гена (то есть многократные копии гена) и повышенную экспрессию транскрипциональным эффектом, и гиперактивность и активацию, включая активацию мутациями. Так, пациент может подвергаться диагностическому тесту на определение маркерной характеристики сверхрегулирования киназы (например, РКА и/или РКВ и/или киназы ROCK и/или P70S6K киназы). Термин диагноз включает скрининг. Маркеры включают генетические маркеры, включающие, например, измерение композиции ДНК на определение мутаций киназы (например, РКА и/или РКВ и/или

киназы ROCK и/или киназы P70S6K). Термин маркер также включает маркеры, которые являются характеристиками сверхрегулирования киназы (например, РКА и/или РКВ и/или киназы ROCK и/или киназы P70S6K) и/или других факторов, которые приводят к сверхрегулированию релевантных передач сигнала, включая активность фермента, 5 уровни фермента, состояние фермента (например, фосфорилирован он или нет) и уровни мРНК указанных выше белков.

Описанные выше диагностические тесты и скрининги обычно проводят на биологическом образце, выбранном из образцов биопсии опухоли, образцов крови (выделение и обогащение опухолевых клеток), биопсий стула, мокроты, хромосомного 10 анализа, плевральной жидкости, перitoneальной жидкости, костного мозга или мочи.

Идентификация индивидуального переноса мутации в РКА и/или РКВ или перегруппировки TCL-1 или недостаток экспрессии PTEN может обозначать, что пациент особенно подходит для лечения ингибитором РКА и/или РКВ. Опухоли преимущественно могут подвергаться скринингу на наличие варианта РКА и/или РКВ 15 до лечения. Процессы скрининга обычно включают прямое секвенирование, олигонуклеотидный микроанализ или мутантные специфические антитела.

Способы идентификации и анализ мутаций и сверхрегулирование белков являются известными специалисту в данной области техники. Методы скрининга могут включать, но не ограничиваются ими, стандартные способы, такие как полимеразная цепная 20 реакция с обратной транскриптазой (RT-PCR) или гибридизация *in-situ*.

При скрининге с RT-PCR, уровень мРНК в опухоли оценивается созданием копий кДНК мРНК, затем амплификацией кДНК с помощью PCR. Методы амплификации PCR, выбор праймеров и условия амплификации являются известными специалисту в данной области техники. Манипуляции с нуклеиновой кислотой и PCR осуществляют 25 стандартными методами, как описано, например, в книге Ausubel, F.M. и др. (ред.), Current Protocols in Molecular Biology, 2004, John Wiley & Sons Inc., или в книге Innis, M.A. и др. (ред.), PCR Protocols: a guide to methods and applications, 1990, Academic Press, San Diego. Реакции и манипуляции, включающие методики с нуклеиновой кислотой, также описаны в книге Sambrook и др., 2001, 3^е издание. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 30 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Альтернативно, может использоваться коммерчески доступный набор для RT-PCR (например, от Roche Molecular Biochemicals), или методика, описанная в патентах США: 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659, 5,272,057, 5,882,864 и 6,218,529 и приведенных здесь в качестве ссылки.

Примером методики гибридизации *in-situ* для оценки экспрессии мРНК может являться 35 флуоресцентная гибридизация *in-situ* (FISH) (см. статью Angerer, 1987, Meth. Enzymol., 152, с.649).

Обычно, гибридизация *in situ* включает следующие основные стадии: (1) фиксация 40 анализируемой ткани; (2) предварительная гибридизационная обработка образца для повышения доступности целевой нуклеиновой кислоты, и для снижения неспецифического связывания; (3) гибридизация смеси нуклеиновых кислот с нуклеиновой кислотой в биологической структуре или ткани; (4) постгибридизация промывок для удаления фрагментов нуклеиновой кислоты, несвязавшихся при гибридизации, и (5) определение гибридизованных фрагментов нуклеиновой кислоты. Пробы, использующиеся в таких исследованиях, обычно помечают, например, 45 радиоизотопами или флуоресцентными репортерами. Предпочтительными пробами являются достаточно длинные, например, от около 50, 100 или 200 нуклеотидов до около 1000 или более нуклеотидов, для осуществления специфической гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой (кислотами) в строгих условиях. Стандартные методы

для осуществления FISH описаны в книгах Ausubel, F.M. и др. (ред.), *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, John Wiley & Sons Inc, и *Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview*, John M.S. Bartlett, *Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols*, 2-ой выпуск; ISBN: 1-59259-760-2; 2004, март, cc.077-088; серии: *Methods in Molecular Medicine*.

5 Альтернативно, продукты белка, экспрессирующиеся из мРНК, могут оцениваться с помощью имmunогистохимии опухолевых образцов, иммуноанализа твердой фазы на микротитровальных планшетах, вестерн-блоттинга, 2-мерного SDS-полиакриламидного гелевого электрофореза, ELISA, поточной цитометрии и других методов, известных из предшествующего уровня техники для определения конкретных 10 белков. Методы определения включают применение сайт-специфичных антител. Специалисту в данной области техники известно, что все такие хорошо известные методики для определения сверхрегулирования киназы (например, РКВ и/или РКА и/или киназы ROCK и/или киназы P70S6K) или определения вариантов киназы могут быть приемлемыми в данном случае.

15 Следовательно, все эти методы также могут использоваться для идентификации опухолей, особенно подходящих для лечения с помощью ингибиторов РКА и/или РКВ и/или киназы ROCK и/или киназы P70S6K.

Например, как показано выше, было обнаружено, что бета РКВ сверхрегулируются в 10-40% случаев рака яичников и поджелудочной железы (статьи Bellacosa и др.. *Int. J. 20 Cancer*, 1995, 64, cc.280-285; Cheng и др., *PNAS*, 1996, 93, cc.3636-3641; Yuan и др., *Oncogene*, 2000, 19, cc.2324-2330). Следовательно, предполагается, что ингибиторы РКВ, и в частности ингибиторы бета РКВ, могут использоваться для лечения рака яичников и поджелудочной железы.

Альфа РКВ амплифицируется при раке желудка, простаты и груди человека (статья 25 *Staal, PNAS*, 1987, 84, cc.5034-5037; Sun и др., *Am. J. Pathol.*, 2001, 159, cc.431-437).

Следовательно, предполагается, что ингибиторы РКВ, и в частности ингибиторы альфа РКВ, могут использоваться для лечения рака желудка, простаты и груди человека.

Повышенная активность гамма РКВ наблюдается в стероид-независимых клеточных линиях груди и простаты (статья Nakatani и др., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, cc.21528-21532).

30 Следовательно, предполагается, что ингибиторы РКВ, и в частности ингибиторы гамма РКВ, могут использоваться для лечения стероид-независимого рака груди и простаты.

Определение ROCK может осуществляться на мРНК или белковом уровне.

Конкретные примеры методов, в которых уровни Rho и ROCK определяют в клинических образцах, включают:

35 - *American Journal of Pathology*, 2002; 160, cc.579-584. Иммуногистохимия на фиксированных формалином тканях для характеристики экспрессии RhoC в тканях груди человека.

40 - *Clinical Cancer Research*, 2003, июль, Т. 9, cc.2632-2641. В этой статье описано применение вестерн-блоттинга для количественного определения экспрессии белка Rho и ROCK в парных опухолевых и неопухолевых хирургических образцах от 107 отобранных японцев с раком мочевого пузыря.

- *Pancreas*, 2002, апрель, 24(3), cc.251-257. В этой статье описана экспрессия ROCK-1 в тканях поджелудочной железы человека путем иммуноблоттинга и иммуногистохимии.

45 - *World J Gastroenterol*, 2003, сентябрь; 9(9), cc.1950-1953. В этой статье описано исследование уровней экспрессии мРНК гена RhoC с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR) в гепатоклеточной карциноме (HCC).

Релевантное методологическое описание в отношении количественного определения уровней активности Rho и/или ROCK или экспрессии, содержащееся в описанных выше

публикациях, приведены здесь полностью в качестве ссылки.

Определение p70S6K может осуществляться либо на уровне мРНК, либо на уровне белка. Такие способы описаны, например, в статье J Natl Cancer Inst, 2000; 92, cc.1252-9 (в которой описано определение активации киназы рибосомального белка S6 с помощью 5 комплементарной ДНК и тканевого микроанализа, используя сравнительную геномную гибридизацию (CGH) и кДНК и тканевые микроанализы для идентификации амплифицированных и сверхэкспрессирующихся генов).

Определение сверхэкспрессированных p70S6K описано в статье Int J Oncol., 2004; 24 (4), cc.893-900. В этой статье описано фармакогеномное профилирование передачи 10 сигнала PDK/PTEN-Akt-mTOR в общих опухолях человека, используя иммуногистохимию для сравнения высокой экспрессии p70S6K, АКТ с опухолевой чувствительностью.

Эксперименты

Настоящее изобретение далее иллюстрируется, но не ограничивается, ссылкой на конкретные варианты осуществления, описанные в следующих методиках и примерах.

15 Исходные материалы для каждой из методик, описанных ниже, являются коммерчески доступными, если не указано иное.

Спектры протономагнитного резонанса (Н ЯМР) записывали на оборудовании Broker AV400 при 400,13 МГц, в Me-d₃-OD при 27°C, если не указано иное, и описаны 20 следующим образом: химический сдвиг δ/ ppm (количество протонов, множественность, где s = синглет, d = дуплет, t = триплет, q = квартет, m = мультиплет, br = расширенный). Остаточный протонный растворитель MeOH (δ_H=3,31 ppm) использовали в качестве внутреннего стандарта.

Полученные в примерах соединения характеризовали жидкостной хроматографией 25 и масс-спектроскопией, используя описанные далее системы и условия проведения. В случае присутствия хлора, масса для соединения является массой для ³⁵Cl. Используемые условия проведения описаны далее.

Основная система

30	Система ВЭЖХ:	Waters 2795
	Масс-спектрометр:	Micromass Platform LC
	PDA детектор:	Waters 2996 PDA

Кислотные аналитические условия 2:

35	Элюент А:	H ₂ O (0,1% муравьиная кислота)
	Элюент В:	CH ₃ CN (0,1% муравьиная кислота)
	Градиент:	5-95% элюент В в течение 3,5 минут
	Поток:	0,8 мл/мин
	Колонка:	Phenomenex Synergi 4 μ Max-RP 80A, 50×2,0 мм

Основные аналитические условия 5:

40	Элюент А:	H ₂ O (10 мМ NH ₄ HCO ₃ буфер, доведенный до pH=9,2 с помощью NH ₄ OH)
	Элюент В:	CH ₃ CN
	Градиент:	05-95% элюент В в течение 3,5 минут
	Поток:	0,8 мл/мин
45	Колонка:	Phenomenex Gemini 5 μ 2,0×50 мм

MS условия:

Капиллярное напряжение:	3,5 кВ или 3,6 кВ
-------------------------	-------------------

Угловое напряжение: 30 В
 Температура источника: 120°C
 Область сканирования: 165-700 атомных единиц массы
 Способ ионизации: Электроспрей отрицательный, положительный или положительный и отрицательный

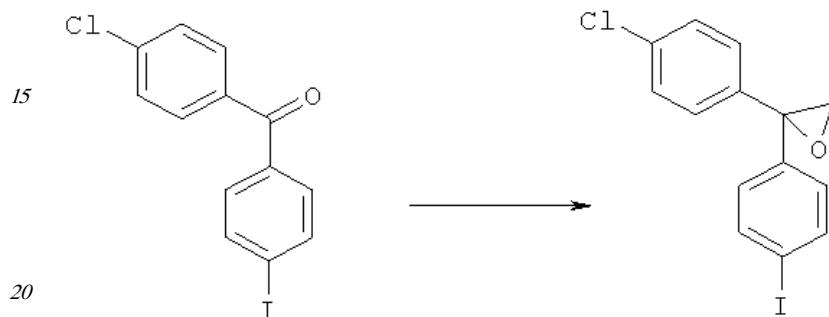
5 В примерах ниже, следующие сокращения использовали для идентификации использующихся условий LCMS:

PS-A2
PS-B5

Основная система - кислотные аналитические условия 2
Основная система - основные аналитические условия 5

10 Пример 1

Получение (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола
1 А. 2-(4-Хлорфенил)-2-(4-йодфенил)оксиран

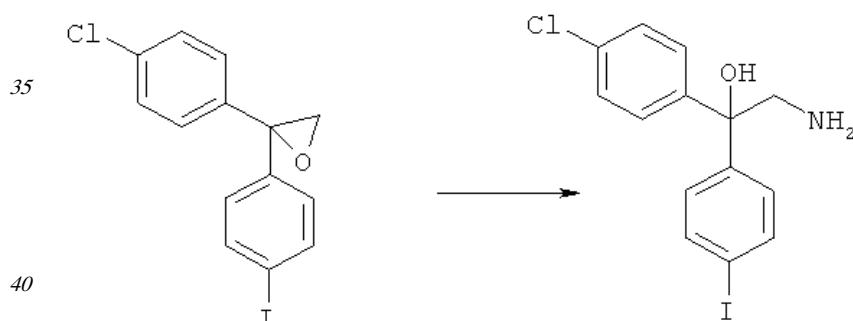


Гидрид натрия (60% дисперсия в масле, 128 мг, 3,2 ммоля) помещали в атмосферу N₂, затем добавляли ДМСО (5 мл). Добавляли йодид trimетилсульфония (0,66 г, 3,2 ммоля) в виде твердого вещества через 15 минут, затем еще через 30 минут (4-хлорфенил)-(4-йодфенил)метанон (1 г, 2,9 ммоля). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов, затем разбавляли этилацетатом и промывали смесью 1:2 вода/насыщенный раствор хлорида натрия, водой и насыщенным раствором хлорида натрия (***)². Органическую фазу сушили (MgSO₄), отфильтровывали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (1,01 г, 97%), которое использовали

25

30 без дополнительной очистки. LCMS (PS-A2) r_t 4,07 мл [M-H]⁻ 355.

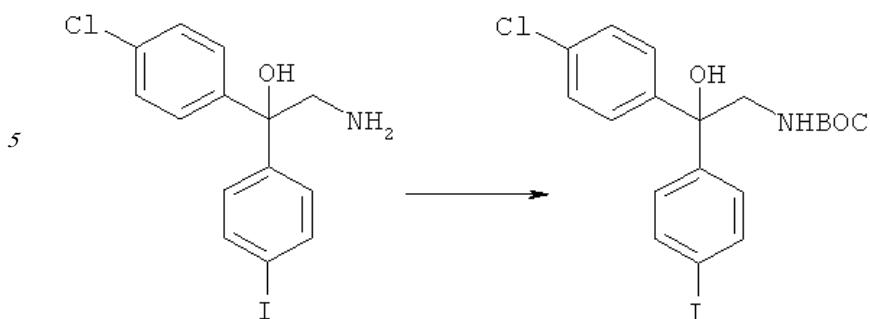
1Б. 2-Амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-йодфенил]этанол (реакция раскрытия эпоксидного кольца)



2-(4-Хлорфенил)-2-(4-йодфенил)оксиран (500 мг, 1,40 ммоля) растворяли в 2М NH₃ в метаноле (5 мл, 10,0 ммолей), и раствор нагревали в микроволновой печи при 130°C в течение 60 минут. После охлаждения растворитель удаляли в вакууме с получением целевого продукта. Проводили три одинаковых реакции и получали 1,55 г (98%) продукта 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-йодфенил]этанола. Сырой продукт очищали и использовали на следующей стадии без очистки.

1 В. трет-Бутиловый эфир [2-(4-хлорфенил)-2-гидрокси-2-(4-йодфенил)этил]

карбаминовой кислоты (BOC-защита)

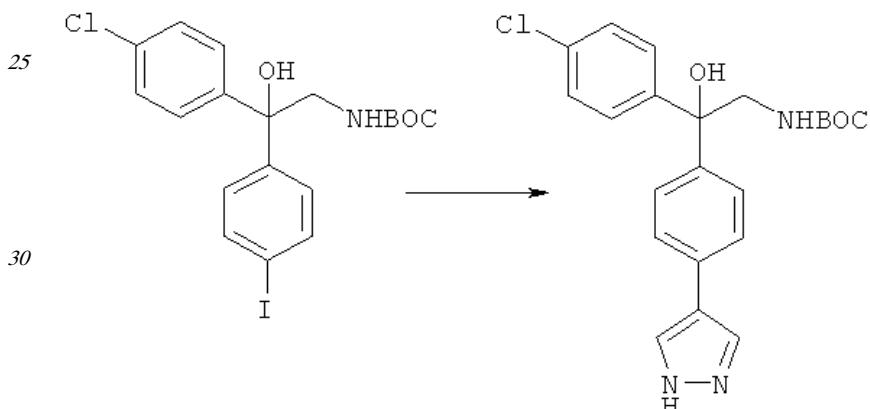


10 Продукт аминоспирта со стадии 1Б (9,55 г, 25,56 ммоля) суспендировали в 1,4-диоксане (220 мл) и добавляли 2М NaOH (16,6 мл, 33,24 ммоля). Смесь интенсивно перемешивали до гомогенизации. Добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (6,14 г, 28,11 ммоля), и реакционную смесь перемешивали при 45°C в течение 20 часов. После охлаждения реакционную смесь концентрировали и разделяли между EtOAc (150 мл) и водой (150 мл). Органический слой отделяли и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (150 мл), сушили ($MgSO_4$) и концентрировали с получением желтого масла (14,08 г). Сырой продукт очищали ускоренной хроматографией, используя Biotage SP4 (колонка 65i), элюируя смесь этилацетат-петролейный эфир (градиент 5%-40% EtOAc) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (10,0 г, 83%). R_t 3,73 мл [M+H] 473,96.

15

20

1Г. трет-Бутиловый эфир [2-(4-хлорфенил)-2-гидрокси-2-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил] этил]карбаминовой кислоты (реакция конденсации Сузуки)



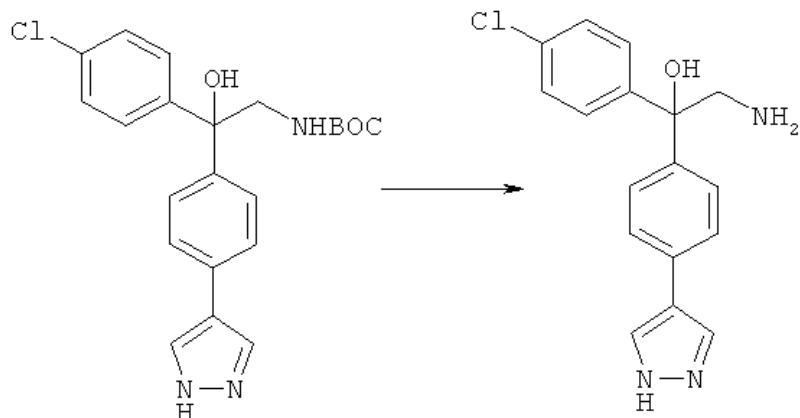
35 трет-Бутиловый эфир [2-(4-хлорфенил)-2-гидрокси-2-(4-йодфенил) этил]карбаминовой кислоты (5 г, 10,6 ммоля) объединяли с 4-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразолом (4,1 г, 21,11 ммоля) и фосфатом калия (триосновный, 7,88 г, 37,10 ммоля) в круглодонной колбе. Твердые вещества затем растворяли в смеси растворителей 1:1:1:1 этанол, метанол, толуол и вода (по 33 мл каждого растворителя).

40 Раствор дегазировали азотом и добавляли тетракистрифенилфосфинпалладий (0) (0,612 г, 0,53 ммоля). Смесь дегазировали азотом и затем нагревали при 85°C в атмосфере азота в течение 2 часов. Реакционную смесь затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Затем добавляли дополнительные партии реагентов: фосфат калия (7,88 г, 37,10 ммоля) и боронат пиразола (4,1 г, 21,11 ммоля). Реакционную смесь дегазировали

45 азотом и добавляли еще порцию тетракистрифенилфосфинпалладия (0) (0,101 г, 0,087 ммоля). Реакционную смесь дегазировали и затем нагревали при 85°C в атмосфере азота в течение 17 часов. Снова добавляли дополнительные порции реагентов (в указанных выше количествах), и нагревание продолжали при 85°C в атмосфере азота

в течение 6,5 часов. Реакционную смесь затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры и упаривали в вакууме для удаления органического растворителя. Полученный водный слой разбавляли водным 2N раствором NaOH (150 мл), затем экстрагировали этилацетатом (150 мл). Органический слой отделяли и промывали водным 2N раствором NaOH (150 мл), затем насыщенным раствором хлорида натрия (150 мл). Органический слой отделяли, сушили (MgSO_4) и концентрировали в вакууме. Остаток обрабатывали диэтиловым эфиром. Твердое вещество отфильтровывали в вакууме, затем сушили с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (2,55 г, 58%). LC/MS: (PS-B5) Rt 3,05 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414,18. ^1H ЯМР ($\text{Me-d}_3\text{-OD}$) 7,95 (2H, br s), 7,55 (2H, d), 7,48-7,41 (4H, m), 7,31 (2H, d), 3,87 (2H, q), 1,35 (9H, s).

1Д. 2-Амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол (стадия снятия защит ВОС)



Суспензию ВОС амина (2,55 г, 6,16 ммоля) в насыщенном HCl в Et_2O (50 мл) и метаноле (50 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и разбавляли 2M раствором NaOH (150 мл) и экстрагировали EtOAc (200 мл) (NB - длительное перемешивание необходимо для полного растворения твердого материала). Органический слой промывали 1N раствором HCl (100 мл). Водный слой затем отделяли и подщелачивали до значения pH 12 с помощью 2M раствора NaOH. Целевой продукт осаждали из раствора и затем собирали вакуумной фильтрацией и сушили в течение нескольких суток (1,89 г, 98%). ^1H ЯМР ($\text{Me-d}_3\text{-od}$) δ 3,29-3,38 (2H, t), 7,32 (2H, d), 7,41-7,46 (4H, t), 7,55 (2H, d), 7,94 (2H, s).

1Е. Хиральное разделение индивидуальных энантиомеров

Используя хиральные методы LC, описанные ниже, соединение (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол отделяли от R-энантиомера.

Хиральные аналитические условия:

Элюент:	$\text{MeOH} + 0,1\% \text{DEA}$ при комнатной температуре
Поток:	0,7 мл/мл
Общее время:	25 мл
Объем впрыска:	5 мкл
Конц. образца:	1 мг/мл (в подвижной фазе)
Колонка:	DAICEL Chiralpak AD-H; 250x4,6 мм
Длина волны:	230 или 257 нм

Хиральные препаративные условия:

Элюент:	$\text{MeOH} + 0,1\% \text{DEA}$ при комнатной температуре
Поток:	13 мл/мл
Общее время:	29 мл

Объем впрыска:

250 мкл

Конц. образца:

100 мг/мл (в подвижной фазе)

Колонка:

DAICEL Chiraldak AD-H; 250x20 мм

Длина волны: 230 или 257 нм

5 Полученный (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол характеризовали поляриметрией, хиральной хроматографией и кристаллографией.

Поляриметрия

10 Оптические активности S-энантиомера и R-энантиомера определяли, используя AA-10 автоматический поляриметр (Optical Activity Limited).

S-Энантиомер

15 22,42 мг соединения растворяли в 2 мл MeOH, длина ячейки=20 см, считывание = +0,31, $[\alpha]_D^{20} = +13,8^\circ$

R-Энантиомер

20,14 мг растворяли в 10 мл MeOH (большее разбавление обусловлено проблемами образования пузырьков в ячейке поляриметра), считывание = -0,03, длина ячейки = 10 см, $[\alpha]_D^{20} = -14,8^\circ$

Хиральная хроматография

25 Используя хиральные аналитические условия, описанные выше, и объем впрыска 5 мкл), S-Энантиомер имеет время удерживания 15,283 минут.

Кристаллография

30 Кристаллографический анализ S-энантиомера в bPKA-PKB осуществляли, используя метод, описанный в статье Thomas G. Davies и др. "A Structural Comparison of Inhibitor Binding to PKB, PKA and PKA-PKB Chimera," J. Mol. Biol., 2007, 9, январь: 17275837.

25 Анализ показывает наличие S-энантиомера, связанного с белком.

Пример 2

Альтернативный синтез 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-йодфенил]этанола

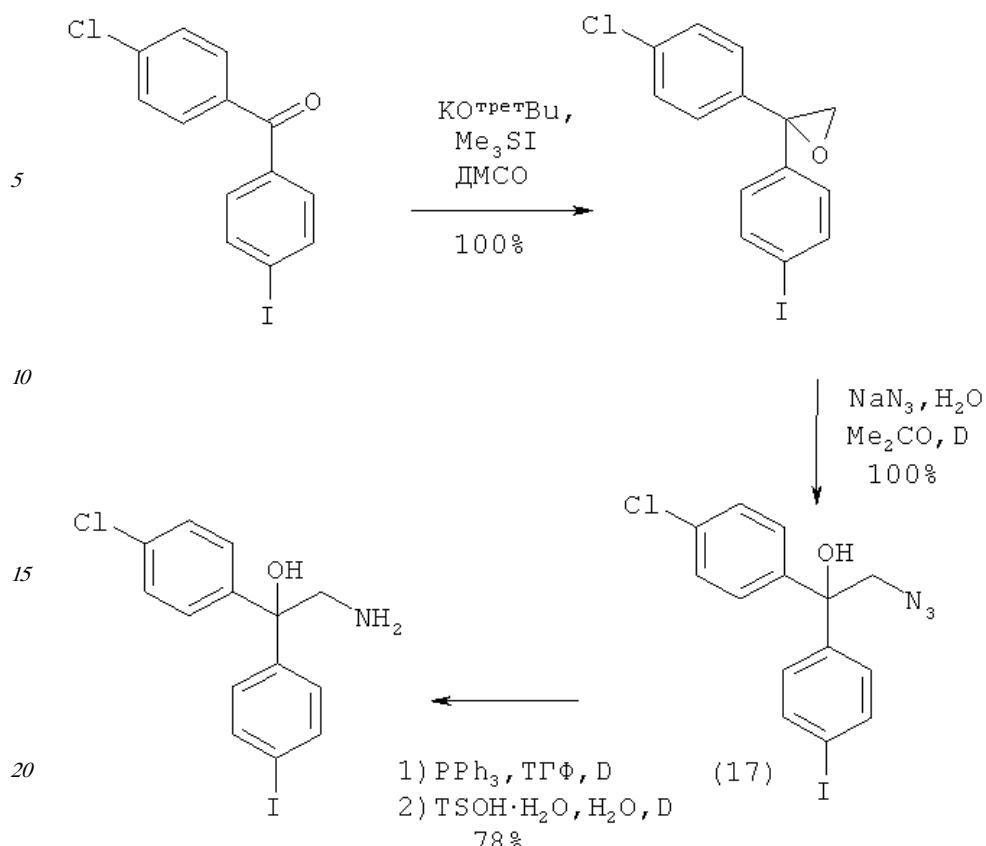
35 В этом примере показано получение 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-йодфенил]этанола, промежуточного соединения 1 В в примере 1.

30

35

40

45



2A. (RS)-2-(4-Хлорфенил)-2-(4-йодфенил)оксиран трет-Бутокстл калия (18,48 г, 165,0 ммолей) добавляли к быстроперемешиваемой суспензии 4-хлор-4'-йодбензофенона (51,38 г, 150,0 ммолей) и йодида триметилсульфония (33,66 г, 165,0 ммолей) в диметилсульфоксиде (200 мл), и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Смесь разбавляли этилацетатом (500 мл), промывали водой (3×500 мл) и затем насыщенным раствором хлорида натрия (500 мл). Органический слой отделяли, и растворитель удаляли в вакууме с получением (RS)-2-(4-хлорфенил)-2-(4-йодфенил)оксирана (53,48 г, 100%) в виде бледно-желтого масла, которое затвердевало при хранении с получением беловатого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО-4) 7,76 (2H, d), 7,45 (2H, d), 7,34 (2H, d), 7,12 (2H, d), 3,32 (2H, m). MS: [M-H]⁻ 355.

35 2B. (RS)-2-Азидо-1-(4-хлорфенил)-1-(4-йодфенил)этанол Азид натрия (13,86 г, 213,2 ммоля) добавляли к смеси (RS)-2-(4-хлорфенил)-2-(4-йодфенил)оксирана (50,66 г, 142,1 ммоля) в ацетоне (400 мл) и воде (40 мл), и смесь перемешивали и кипятили с обратным холодильником в течение 4 суток. При охлаждении до комнатной температуры ацетон удаляли в вакууме, остаток растворяли в этилацетате (500 мл), промывали водой (250 мл) и затем насыщенным раствором хлорида натрия (250 мл), органический слой отделяли, и растворитель удаляли в вакууме с получением (RS)-2-азидо-1-(4-хлорфенил)-1-(4-йодфенил)этанола (56,77 г, 100%) в виде бледно-желтого масла, которое медленно затвердевало при хранении с получением беловатого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО-d₆) 7,68 (2H, d), 7,44 (2H, d), 7,38 (2H, d), 7,24 (2H, d), 6,38 (1H, br s), 3,99 (2H, s).

45 MS: [M-H]⁻ 398.

2B. (RS)-2-Аммонио-1-(4-хлорфенил)-1-(4-йодфенил)этанолтолуол-4-сульфонат Трифенилfosфин (31,44 г, 120,0 ммолей) добавляли к раствору (RS)-2-азидо-1-(4-хлорфенил)-1-(4-йодфенил)этанола (47,94 г, 120,0 ммолей) в тетрагидрофуране (400 мл),

и смесь перемешивали и кипятили с обратным холодильником в течение 5 часов, затем добавляли моногидрат толуол-4-сульфоновой кислоты (22,8 г, 120,0 ммолей) и воду (40 мл), и смесь перемешивали и кипятили с обратным холодильником в течение 16 часов. После охлаждения до комнатной температуры смесь упаривали досуха в вакууме.

5 Добавляли этилацетат (600 мл), и смесь перемешивали быстро при комнатной температуре в течение 30 минут для повторного суспенсирования твердых веществ. Твердые вещества собирали фильтрацией с отсосом, промывали этилацетатом (3×250 мл), сушили при пониженном давлении и сушили в течение ночи при 50°C в вакуумной печи с получением (RS)-2-аммонио-1-(4-хлорфенил)-1-(4-йодфенил)этанолтолуол-4-
10 сульфоната (51,37 г, 78%) в виде бесцветного твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО-d₆) 7,73 (2H, d), 7,68 (3H, br s), 7,47 (4H, m), 7,43 (2H, d), 7,28 (2H, d), 7,12 (2H, d), 6,60 (1H, br s), 3,67 (2H, s), 2,30 (3H, s). MS: [M+H]⁺ 374.

Продукт примера 2В может быть превращен в n-бенз производное способом примера 1В (но используя дополнительный эквивалент гидроксида натрия для получения количества соли толуолсульфоновой кислоты), и затем подвергали реакции конденсации Сузуки, затем удаляли защитную группу Вое как описано в примере 1Г и примере 1Д, и полученную смесь энантиомеров разделяли способом примера 1Е с получением (5')-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола.

20 Биологическая активность

Биологическая активность соединения формулы (I) описана в следующих примерах. Кроме того, биологические свойства соединения формулы (I) описаны в обзоре John F. Lyons и др., с.3512s, Poster Session B, Abstract B251, AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2007, октябрь 22-26, Сан-Франциско, 25 Канада (копия доступна на web-сайте Astex Therapeutics: www.astex-therapeutics.com или www.astex-therapeutics.com/investorsandmedia/publications).

Пример 3

Измерение ингибирующей активности в отношении киназы РКА (IC₅₀)

Соединение формулы (I) может тестироваться на ингибирующую активность в 30 отношении РК, используя каталитический домен РКА от Upstate Biotechnology (#14-440) и 9 остатков конкретного пептида РКА (GRTGRRNSI), также от Upstate Biotechnology (#12-257), в качестве субстрата. Конечную концентрацию 1 нМ фермента использовали в буфере, который содержит 20 мМ MOPS pH 7,2, 40 мКМ АТФ/γ³³P-АТФ и 50 мМ субстрата. Соединения добавляли в растворе в диметилсульфоксиде (ДМСО) до 35 конечной концентрации ДМСО 2,5%. Реакцию оставляли на 20 минут, затем добавляли избыток ортофосфорной кислоты для того, чтобы погасить активность. Несвязавшийся γ³³P-АТФ затем отделяли от фосфорилированных белков на фильтровальных пластинах Millipore МАРН. Фильтровальные пластины промывали, добавляли сцинтилирующее 40 вещество, и пластины затем подвергали количественной обработке на Packard Topcount.

Рассчитывали процентное ингибирование активности РКА и наносили на график для того, чтобы определить концентрацию тестируемого соединения, необходимую для ингибирования 50% активности РКА (IC₅₀).

Следуя описанной выше методике, (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол обеспечивает 44% ингибирование РКА в концентрации 0,03 мКМ, тогда как значение IC₅₀ (R)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола составляет 0,25 мКМ. Результаты показывают, что 5-энантиомер существенно более активен по сравнению с R-энантиомером в анализе с РКА.

Пример 4

Измерение ингибирующей активности в отношении киназы PKB (IC₅₀)

Ингибирование активности протеинкиназы B (PKB) соединениями может быть определено по существу как описано в статье Andjelkovic и др. (Mbi. Cell. BioL, 1999, 19, cc.5061-5072), но используя слитой белок, описанный как PKB-PIF и полностью описанный в статье Yang и др. (Nature Structural Biology, 2002, 9, cc.940-944). Белок очищали и активировали PDK1 как описано в статье Yang и др. Пептид AKTide-2T (H-A-R-K-R-E-R-T-Y-S-F-G-H-H-A-OH), полученный от Calbiochem (#123900), использовали в качестве субстрата. Конечную концентрацию 0,6 нМ фермента использовали в буфере, который содержал 20 мМ MOPS pH 7,2, 30 мкМ АТФ/γ³³P-АТФ и 25 мкМ субстрата. Соединения добавляли в растворе в ДМСО до конечной концентрации ДМСО 2,5%. Реакцию оставляли на 20 минут, затем добавляли избыток ортофосфорной кислоты для того, чтобы погасить активность. Реакционную смесь переносили на фосфоцеллюлозную фильтровальную пластину, на которой пептид связывался, и неиспользованный АТФ смывали. После промывки добавляли сцинтилирующее вещество, и полученную активность измеряли с помощью сцинтиляции.

Рассчитывали процентное ингибирирование активности PKB и наносили на график для того, чтобы определить концентрацию тестируемого соединения, необходимую для ингибирирования 50% активности PKB (IC₅₀).

Следуя описанной выше методике, значение IC₅₀ (5)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола составляет 0,01 мкМ, тогда как значение IC₅₀ (R)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола составляет 0,96 мкМ. Результаты показывают, что S-энантиомер приблизительно в 100 раз сильнее по сравнению с R-энантиомером в анализе с PKB.

Пример 5

Активность в отношении hERG

Активность соединения формулы (I) в отношении ионного канала hERG K может быть определена, используя анализ, описанный в статье M. H. Bridgland-Taylor и др. Journal of Pharmaceutical and Toxicological Methods, 2006, 54, cc.189-199.

Пример 6

Определение активности в отношении цитохрома P450

Активность соединения примера 1 в отношении фермента цитохрома P450 (CYP450) 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 и 2D6 определяли, используя скрининговые наборы Pan Vera Vivid CYP450 от Invitrogen (Paisley, Великобритания). CYP450 получали в форме бакулосом, содержащих CYP450 и редуктазу NADPH, и использовали флуоресцентные яркие субстраты. Конечные реакционные смеси имели следующий состав:

1A2

100 мМ фосфата калия, pH 8, 1% ацетонитрила, 2 мкМ 1A2 субстрата голубого яркого, 100 мкМ NADP⁺, 4 нМ CYP450 1A2, 2,66 мМ глюкоза-6-фосфата, 0,32 U/мл глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы.

2C9

50 мМ фосфата калия, pH 8, 1% ацетонитрила, 2 мкМ субстрата зеленого яркого, 100 мкМ NADP⁺, 8 нМ CYP450 2C9, 2,66 мМ глюкоза-6-фосфата, 0,32 U/мл глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы.

2C19

50 мМ фосфата калия, pH 8, 1% ацетонитрила, 8 мкМ субстрата голубого яркого,

100 мкМ NADP⁺, 4 нМ CYP450 2C19, 2,66 мМ глюкоза-6-фосфата, 0,32 У/мл глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы.

3A4

100 мМ фосфата калия, pH 8, 1% ацетонитрила, 10 мкМ 3A4 субстрата голубого

яркого, 100 мкМ NADP⁺, 2,5 нМ CYP450 3A4, 2,66 мМ глюкоза-6-фосфата, 0,32 У/мл глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы.

2D6

100 мМ фосфата калия, pH 8, 1% ацетонитрила, 5 мкМ 2D6 субстрата голубого

яркого, 100 мкМ NADP⁺, 16 нМ CYP450 2D6, 2,66 мМ глюкоза-6-фосфата, 0,32 У/мл глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы.

За флуоресценцией наблюдали в течение 20 минут с 30 секундными интервалами на планшетном счетчике Fluoroskan fluorescence. Длины волн возбуждения и излучения составляли 390 нм и 460 нм для 1A2, 2C19 и 3A4, 390 нм и 485 нм для 2D6 и 485 нм и 530 нм для 2C9. Начальные скорости определяли из кривых роста.

Тестируемое соединение получали в растворе ацетонитрила и тестировали в отношении CYP450 в концентрации 10 мкМ.

Соединение примера 1 имеет значение IC₅₀ более 10 мкМ в отношении 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 и 2D6.

Пример 7

Клеточный анализ фосфо-Ser9 Gsk3β ELISA в отношении pSer9 GSKβ

Действие на ингибирование PKB в клетках U87MG определяли по способности соединений ингибировать фосфорилирование прямого последующего субстрата GSK3β в серине 9. Клетки помещали в 96-луночные планшеты и оставляли в течение ночи, затем добавляли ингибирующее соединение в течение 1 ч. Через 1 час клетки фиксировали и блокировали 3% параформальдегидом, 0,25% глутеральдегидом, 0,25% Triton XI 00 и 5% Marvel в TBS-T. Затем эти клетки инкубировали с первичными антителами, направленными на фосфорилированную форму GSK3β (Cell Signaling) в течение ночи при 4°C. После промывания клетки инкубировали со вторичными антителами, используя реагенты DELFIA (Eu-N1 анти-кролика IgG антитело) в течение 1 ч, и затем планшеты считывали на флуоресцентном счетчике с разрешением по времени при длине волны возбуждения 340 нм и излучения 640 нм. Все клетки получали от ECACC (European Collection of Cell Cultures).

Методика

1. U87MG клетки помещали в количестве 12,500 клеток/лунка в 160 мкл среды/ленка в 96-луночную планшету

2. Инкубировали в течение 24 часов при 37°C

3. Обрабатывали клетки ингибитором и ДМСО контролем

4. Инкубировали в течение 1 часа при 37°C

5. Среду стряхивали с планшеты на бумагу

6. 100 мкл фиксирующего раствора добавляли в каждую лунку (3% параформальдегида, 0,25% глутеральдегида, 0,25% Triton X100)

7. Инкубировали в течение 30 минут при 37°C

8. Промывали 1 раз водой/0,1% Tween 20

9. Блокировали 100 мкл 5% раствора молоко/TBS-T

10. Инкубировали в течение 30 минут при 37°C

11. 100 мкл первичных антител, разбавленных в 5% растворе молоко/TBS-T, добавляли в каждую лунку (CST #9336 фосфо-Ser9 GSK3β антитело использовали 1:

250)

- включали контрольную колонку без 1 - только 5% раствора молоко/TBS-T
- также можно включать колонку Zymed кролика IgG (02-6102-5 мг/мл) контроля, разбавленного в 5% растворе молоко/TBS-T, до той же концентрации, что и фосфо-Ser9

5 GSK3 β , при необходимости

12. Инкубировали в течение ночи при 4°C

13. Промывали 3 раза раствором вода/O, 1% Tween 20

14. 100 мкл вторичных антител, разбавленных в буфере для анализа Delfia, добавляли в каждую лунку (Delfia Eu-NI анти-кролик IgG антитело, используя 0,30 мкг/мл конечная 10 концентрация)

15. Инкубировали в течение 1 часа при 37°C

16. Промывали 3 раза раствором вода/0,1% Tween 20

17. 100 мкл поддерживающего раствора Delfia добавляли в каждую лунку

18. Перемешивали на планшетном шейкере в течение 15 минут

15 19. Считывали на устройстве Delfia (возбуждение 340 нм - излучение 640 нм)=подсчет европием

20 20. Промывали 1 раз раствором вода/0,1% Tween 20

21. 200 мкл раствора BCA добавляли на лунку (BCA с 1:50 сульфатом меди II)

22. Инкубировали в течение 30 минут при 37°C

20 23. Считывали при поглощении 562 нм = концентрация белка Соединение (S)-2-амино-1 -(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол имеет значение IC₅₀ 1,1 мкМ в описанном выше механическом анализе, тогда как значение IC₅₀ (R)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанола составляет >50 мкМ, то есть R-энантиомер по существу является неактивным.

25 Пример 8

Методика анализа с ROCK-II (человека)

Соединение (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол тестировали в анализе с ROCK-II как описано далее.

30 В конечном реакционном объеме 25 мкл ROCK-II (человека) (5-10 мU) инкубировали с 50 мМ Tris pH 7,5, 0,1 мМ EGTA, 30 мкМ KEAKEKRQEIQIAKRRRLSSLRASTS KSGGS QK, 10 мМ ацетата Mg и [γ -³³P-АТФ] (специфическая активность около 500 срт/пмоль, необходимая концентрация). Реакцию инициировали добавлением смеси MgATO. После инкубирования в течение 40 минут при комнатной температуре, реакцию останавливали 35 добавлением 5 мкл 3% раствора фосфорной кислоты. 10 мкл реакционной смеси затем прикалывали на плоский фильтр P30 и промывали три раза в течение 5 минут в 75 мМ фосфорной кислоты и один раз в метаноле, затем сушили и количественно определяли сцинтилляцию.

35 В описанном выше анализе (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил] этанол имеет значение IC₅₀ менее 10 нМ, то есть ниже границы анализа.

40 Пример 9

Радиометрический анализ с p70S6K

Соединение (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол тестировали в радиометрическом анализе с p70S6K как описано далее.

45 Общие условия

Фермент P70S6 получали от Upstate и использовали в концентрации 2 нМ в анализе.

Субстратную смесь S6 (AKRRRLSSLRA) использовали в концентрации 25 мкМ (K_m не определяли). В реакции переноса фосфорила, ³³P- γ фосфат от АТФ переносится на

остаток серина. Реакционную смесь переносили на фосфоцеллюзную фильтровальную пластины, где пептид связывался, и неиспользуемый АТФ смывали. После промывки добавляли сцинтилирующее вещество, и активность измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика.

5 Реагенты

Киназа P70S6 (T412E) от Upstate (#14-486)

S6 киназная субстратная смесь от Upstate (#20-122)

10 10 мМ MOPS pH 7,0
0,1 мг/млБСА
0,001%Brig-35
0,5% глицерина
0,2 мМ EDTA
10 мМ MgCl₂

Буфер для анализа

0,01% β-меркаптоэтанола

15 Получали как 10Х стоковый раствор, хранили при 20°C
в 2 мл аликоватах
15 мкМАТФ

20 АТФ (10 мМ стоковый раствор) добавляли свежим в концентрированные стоковые растворы. АТФ со временем разрушается, его хранят на льду насколько возможно и используют небольшие аликовоты для обеспечения свежести стокового раствора.

γ³³P-АТФ APBiotech (BF1000)

12,5% ортофосфорная кислота

0,5% ортофосфорная кислота

Microscint 20 (Packard)

25 Получение смеси для анализа

Смесь фермента (на 1 мл-100 аналитических частей):

743,75 мкл H₂O

250 мкл 10х буфер для анализа

3,75 мкл 10 мМ АТФ

30 2,5 мкл фермента

Смесь субстрата (на 1 мл-100 аналитических частей):

250 мкл S6 субстратная смесь

750 мкл H₂O

35 3,5 мкл ³³P-АТФ (BF1000 от APBiotech)

Количество ³³P-АТФ добавляли, основываясь на его справочные данные.

Точное количество необходимо довести со временем.

40 Соединения получали в кривых разбавления в ДМСО в полипропиленовых 96-луночных планшетах в 40х конечной концентрации анализа (конечное содержание ДМСО 2,5%).

Разбавление 1:8 в воде (добавление 5 мкл соединения в 35 мкл воды является достаточным).

Схема анализа

В полипропиленовую 96-луночную планшету добавляли по порядку:

45 - 5 мкл соединения

- 10 мкл смеси субстрата

- 10 мкл смеси фермента

Конечная концентрация АТФ составляет приблизительно 15 мкМ. КМ для АТФ

рассчитывали до 47 μ M радиометрически. Контроли не содержали соединения (только ДМСО) и не содержали фермента (использование 10 мкл смеси фермента до добавления фермента). Закрывали крышкой для планшет (TopSeal A - Packard) или пластиковой крышкой от фильтровальной планшеты (средний радиационный барьер). Смешивали 5 мягким встряхиванием. Инкубировали при комнатной температуре в течение 50 минут. Останавливали реакцию добавлением 20 мкл 2% раствора ортофосфорной кислоты.

Стадия фильтрации

Предварительно промывали лунки Millipore МАРН НОВ планшеты с помощью 50 мкл промывочного буфера с 0,5% раствором ортофосфорной кислоты. Фильтр 10 освобождали от жидкости с помощью вакуумного фильтрационного насоса Millipore. Переносили всю остановленную реакционную смесь в лунки. Отфильтровывали. Промывали дважды по 200 мкл промывочного буфера с 0,5% раствором ортофосфорной кислоты, Вакуумировали почти досуха. Удаляли подставку для планшеты и оставляли 15 фильтры сушиться на тканевой бумаге. Помещали планшету в адаптер для Packard TopCount. Добавляли 20 мкл сцинтиллирующего вещества Microscint 20, закрывали листом Topseal A и обрабатывали в течение 30 сек на TopCount.

В этом анализе (S)-2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1Н-пиразол-4-ил)фенил]этанол имеет значение IC_{50} 12 нМ.

Фармацевтические составы

Пример 10

(i) Состав таблетки

Композицию таблетки, включающую композицию как здесь определено, получали смешением 50 мг соединения с 197 мг лактозы (ВР) в качестве разбавителя и 3 мг стеарата магния в качестве лубриканта, и спрессовывали с получением таблетки 25 известным способом.

(ii) Состав капсулы

Состав капсулы получали смешением 100 мг композиции как здесь определено с 100 мг лактозы, и заполняли полученной смесью стандартные непрозрачные твердые желатиновые капсулы.

(iii) Инъекционный состав I

Парентеральная композиция для введения инъекцией может быть получена растворением композиции как здесь определено (например, в форме соли) в воде, содержащей 10% пропиленгликоля, с получением концентрации активного соединения 1,5% по весу. Раствор затем стерилизовали фильтрацией, заполняли им ампулу и 35 закрывали.

(iv) Инъекционный состав II

Парентеральную композицию для инъекции получали растворением в воде композиции как здесь определено (например, в форме соли) (2 мг/мл) и маннита (50 мг/мл), стерильным фильтрованием раствора и заполнением им закрывающихся 40 1 мл сосудов или ампул.

v) Инъекционный состав III

Состав для внутривенной доставки инъекцией или инфузией может быть получен растворением соединения формулы (I) (например, в форме соли) в воде в концентрации 20 мг/мл. Сосуд затем закрывали и стерилизовали в автоклаве.

vi) Инъекционный состав IV

Состав для внутривенной доставки инъекцией или инфузией может быть получен растворением соединения формулы (I) (например, в форме соли) в воде, содержащей буфер (например, 0,2 М ацетата с pH 4,6) в концентрации 20 мг/мл. Сосуд затем

закрывали и стерилизовали в автоклаве.

(vii) Подкожный инъекционный состав

Композицию для подкожного введения получали смешением композиции как здесь определено с фармацевтическим кукурузным маслом с получением концентрации 5 мг/5 мл. Композицию стерилизовали и заполняли ею подходящую емкость.

(viii) Лиофилизованный состав

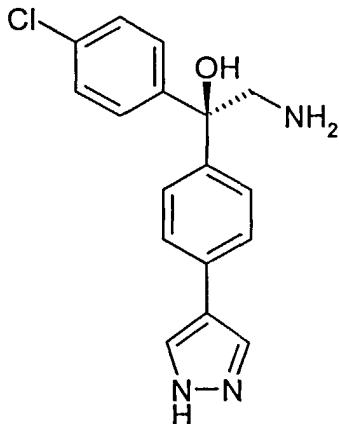
Аликвоты полученного соединения формулы (I) помещали в сосуды объемом 50 мл и лиофилизовали. В процессе лиофилизации композиции замораживали, используя одностадийную методику замораживания при (-45°C). Температуру повышали до -10°C 10 для отжига, затем замораживали до -45°C, затем проводили первичную сушку при +25°C в течение приблизительно 3400 минут, затем проводили вторичную сушку с повышением температуры постадийно до 50°C. Давление в процессе первичной и вторичной сушки выдерживали при 80 миллиторр.

Эквиваленты

15 Приведенные выше примеры приведены в целях иллюстрации изобретения и никак не должны ограничивать объем изобретения. Ясно, что многочисленные модификации и изменения могут быть сделаны в конкретных вариантах осуществления по изобретению, описанных выше, и иллюстрированных в примерах без выхода за принципы основы изобретения. Все такие модификации и изменения охватываются 20 данной заявкой.

Формула изобретения

1. Соединение формулы (I):



25 или его соль, сольват, таутомер или N-оксид, где указанное соединение имеет энантиомерную чистоту по крайней мере 80%.

30 2. Соединение по п.1, где указанное соединение имеет энантиомерную чистоту по крайней мере 95%.

35 3. Соединение по п.1, где указанное соединение имеет энантиомерную чистоту по крайней мере 99,5%.

40 4. Соединение формулы (I) по любому из пп.1-3 в форме свободного основания или его соли, сольвата или таутомера.

45 5. Соединение по п.4, которое представляет собой моно-соль, образованную с хлористоводородной кислотой.

6. Соединение по п.4, которое представляет собой ди-соль, образованную с хлористоводородной кислотой.

7. Фармацевтическая композиция, обладающая активностью модуляторов протеинкиназы, содержащая соединение по любому из пп.1-6 и фармацевтически

приемлемый носитель.

8. Соединение по любому из пп.1-6 для применения в медицине, обладающее активностью модуляторов протеинкиназы.

9. Композиция по п.7 или соединение для применения по п.8, для применения для

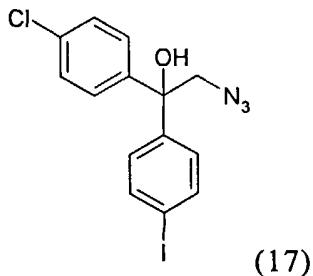
5 профилактики или лечения заболевания или состояния, которое выбрано из карциномы мочевого пузыря, груди, толстой кишки, почек, эпидермиса, печени, легких, пищевода, желчного пузыря, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, эндометрия, щитовидной железы, простаты или кожи, гематопоэтических опухолей лимфоидного происхождения, тироидного фолликулярного рака, опухолей мезенхимального

10 происхождения, опухолей центральной или периферийной нервной системы, меланомы, семиномы, тератокарциномы, остеосаркомы, пигментной ксенодеромы, кератоктантомы, тироидного фолликулярного рака или саркомы Капоши; рака груди, рака яичников, рака толстой кишки, рака простаты, рака пищевода, плоскоклеточной карциномы и карциномы немалых клеток легких.

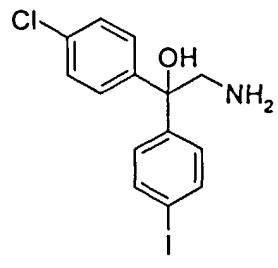
15 10. Способ получения соединения по любому из пп.1-6, который включает частичное или полное разделение смеси (S)- и (R)-энантиомеров 2-амино-1-(4-хлорфенил)-1-[4-(1h-пиразол-4-ил)фенил]этанола.

11. Способ по п.10, в котором (S)- и (R)-энантиомеры разделяют с помощью хиральной хроматографии.

20 12. Соединение формулы (17):



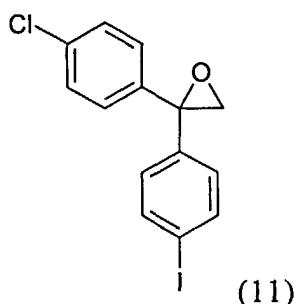
13. Способ получения соединения формулы (12)



35 который включает реакцию соединения формулы (17) по п.12 с третичным фосфином, таким как трифенилфосфин, в полярном аprotонном растворителе с последующей обработкой водной кислотой.

40 14. Способ по п.13, в котором водная кислота включает алкил- или арилсульфоновую кислоту, выбранную из метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, толуолсульфоновой кислоты и камфорсульфоновой кислоты, и наиболее предпочтительно 4-толуолсульфоновой кислоты.

45 15. Способ получения соединения формулы (17) по п.12, который включает реакцию эпоксидного соединения формулы (II):



10 с азидом, выбранным из азидов щелочного металла и триметилсилазида, в полярном растворителе, предпочтительно при нагревании.

16. Способ по п.15, в котором азид представляет собой азид щелочного металла.

17. Способ по п.16, в котором азид щелочного металла представляет собой азид натрия.

15 18. Способ получения соединения формулы (12) по п.13, который включает способ по любому из пп.15-17, проводимый после способа по п.13 или 14.

20

25

30

35

40

45