



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121678** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C07D 498/04 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61P 35/00

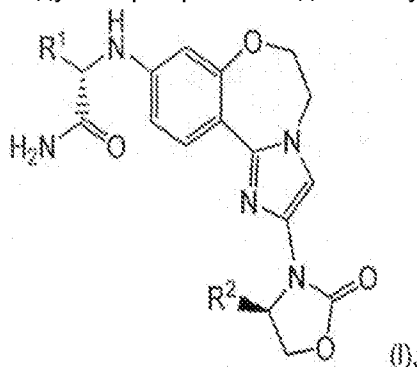
МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 00851	(72) Винахідник(и):	Браун Марі-Габріель (US), Елліотт Річард (GB), Хенен Емілі (US), Хілд Роберт Ендрю (GB), Маклеод Калум (GB), Стабен Стівен Т. (US)
(22) Дата подання заявки:	01.07.2016	(73) Власник(и):	Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.07.2020	(74) Представник:	Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/188,029	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 8 242 104 B2, 14.08.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	02.07.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.06.2018, Бюл.№ 12		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.07.2020, Бюл.№ 13		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2016/065455, 01.07.2016		

(54) СПОЛУКА БЕНЗОКСАЗЕПІНОКСАЗОЛІДИНОНІВ ТА СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

У даній заявці описані сполуки бензоксазепіноксазолідинонів з активністю або функцією, що модулює фосфоінозитид-3-кіназу (PI3K), які мають структуру сполуки формули I:



або їх стереоізомери, таутомери, або їх фармацевтично прийнятні солі, і такі, що мають замісники і структурні ознаки, описані в даній заявці. Також описані фармацевтичні композиції і лікарські засоби, які включають в себе сполуки формули I, а також способи застосування таких

UA 121678 C2

модуляторів PI3K, окремо і в комбінації з іншими терапевтичними агентами, для лікування захворювань або станів, опосередковуваних розрегуляцією PI3K-шляху або залежних від цього.

Перехресне посилання на споріднені заявки

Дана заявка, що не є попередньою, подана відповідно до §1.53 (b) п. 37 Зводу федеральних правил (CFR), просить, згідно §119 (e) глави 35 Зводу законів США (USC), пріоритет на підставі попередньої заявки США з серійним № 62/188029, поданої 2 липня 2015 року, яка включена за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Область винаходу

В цілому даний винахід відноситься до сполук бензоксазепіноксазолідинонів з активністю, направленою проти гіперпроліферативних розладів, таких як рак. Винахід також відноситься до способів застосування даних сполук для діагностики або обробки *in vitro*, *in situ* та *in vivo* клітин ссавців або лікування асоційованих патологічних станів.

Попередній рівень техніки

Активация опосередкованого фосфоінозитидів-3-кіназою (PI3K)/Akt (протеїнкіназа B) сигнального шляху є загальною ознакою більшості ракових захворювань (Yuan and Cantley (2008) *Oncogene*, 27: 5497-510). Генетичні відхилення, що стосуються даного шляху, були виявлені в багатьох випадках раку у людини (Osaka et al. (2004) *Apoptosis*, 9: 667-76), та їх вплив переважно пов'язаний із стимулюванням проліферації, міграції та виживання клітин. Активация даного шляху відбувається внаслідок активуючих точкових мутацій або ампліфікації гена PIK3CA (від англ. phosphatidylinositol-3-kinase, catalytic subunit alpha - каталітична альфа-субодиниця фосфатидилінозитол-3-кінази), що кодує p110a (альфа) ізоформ PI3K (Hennessy et al. (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4: 988-1004). Генетична делеція або призводять до втрати функціональності мутації в гені онкосупресора PTEN (від англ. phosphatase and tensin homolog - гомолог фосфатази і тензину), фосфатази з функцією, протилежною PI3K, також підсилює PI3K-опосередкований шлях передачі сигналу (Zhang and Yu (2010) *Clin. Cancer Res.*, 16: 4325-30). Ці порушення призводять до посилення наступних ланок передачі сигналу за участю таких кіназ, як Akt і mTOR (мішень рапаміцину у ссавців), і висловлено припущення, що підвищення активності PI3K-шляху є ознакою резистентності до лікування раку (Opel et al. (2007) *Cancer Res.*, 67: 735-45; Razis et al. (2011) *Breast Cancer Res. Treat.*, 128: 447-56).

Фосфатидилінозитол-3-кіназа (PI3K) є основним вузлом шляху передачі сигналу для ключових сигналів, пов'язаних з виживанням і зростанням в разі лімфом, і вона володіє активністю, протилежною активності фосфатази PTEN. Залежний від фосфоінозитидів-3-кінази (PI3K) сигнальний шлях є самим розрегульований шляхом в разі позитивного відносно рецепторів гормонів раку молочної залози (HR+ BC). PI3K-шлях також розрегульований при агресивних формах лімфоми (Abubaker (2007) *Leukemia*, 21: 2368-2370). У восьми відсотках випадків раку типу DLBCL (дифузійної В-клітинної крупноклітинної лімфоми) є міссенс-мутації в гені PIK3CA (каталітичної альфа-субодиниці фосфатидилінозитол-3-кінази), а 37% випадків за даними імуногістохімічного тестування є PTEN-негативними.

Фосфатидилінозит є одним з ряду фосфоліпідів, виявлених в клітинних мембранах і які беруть участь у внутрішньоклітинній передачі сигналу. Передача сигналу в клітинах, опосередкована 3'-фосфорильованими фосфоінозидами, залучена в цілий ряд клітинних процесів, наприклад, малігнізацію, передачу сигналу за участю ростових факторів, запалення і імунітет (Rameh et al. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274: 8347-8350). Фермент, що відповідає за утворення таких фосфорильованих продуктів сигнального шляху, фосфатидилінозитол-3-кіназу (яка також позначається як PI 3-кіназа або PI3K), спочатку ідентифікували за активністю, асоційованою з вірусними онкобілками і тирозинкіназами, які є рецепторами ростових факторів, які фосфорилують фосфатидилінозит (PI) і його фосфорильовані похідні по 3'-гідроксилу кільця інозиту (Panayotou et al. (1992) *Trends Cell Biol.*, 2: 358-60). Фосфоінозитид-3-кінази (PI3K) являють собою ліпідні кінази, які фосфорилують ліпіди по 3-гідроксильному залишку кільця інозиту (Whitman et al. (1988) *Nature*, 332: 664). 3-Фосфорильовані фосфоліпіди (PIP3 (фосфатидилінозит-(3,4,5)-трифосфат)), утворені за допомогою PI3-кіназ, діють як вторинні месенджери, які залучають кінази з ліпід-зв'язуючими доменами (включаючи плекстрин-гомологічні (PH) ділянки), такі як Akt і фосфоінозитид-залежна кіназа-1 (PDK1) (Vivanco et al. (2002) *Nature Rev. Cancer*, 2: 489; Phillips et al. (1998) *Cancer*, 83: 41).

Сімейство PI3-кіназ містить щонайменше 15 різних ферментів, систематизованих за структурною гомологією і розділених на 3 класи на основі гомології послідовностей та продукту, що утворюється в результаті ферментативного каталізу. PI3-кінази I класу складаються з 2 субодиниць: каталітичної субодиниці з молекулярною масою (ММ) 110 кілодальтон (кДа) і регуляторної субодиниці з ММ 85 кДа. Регуляторні субодиниці містять SH2-домени (src-гомологічні домени 2) і зв'язуються з залишками тирозину, фосфорильованими під дією рецепторів ростових факторів, що мають тирозинкіназну активність, або продуктів онкогенів, індукуючи тим самим PI3K-активність каталітичної субодиниці p110, яка фосфорилує свій

ліпідний субстрат. PI3-кінази I класу залучені в важливі події передачі сигналу вниз по шляху цитокінів, інтегринів, ростових факторів та імунорецепторів, що передбачає, що регулювання цього шляху може призводити до одержання важливих терапевтичних ефектів, таких як модулювання клітинної проліферації і канцерогенезу. PI3K I класу можуть фосфорилувати фосфатидилінозит (PI), фосфатидилінозит-4-фосфат і фосфатидилінозит-4,5-біфосфат (PIP2) з одержанням фосфатидилінозит-3-фосфату (PIP), фосфатидилінозит-3,4-біфосфату і фосфатидилінозит-3,4,5-трифосфату, відповідно. PI3K II класу фосфорилують PI і фосфатидилінозит-4-фосфат. PI3K III класу можуть фосфорилувати тільки PI. Ключовою ізоформою PI3-кіназ при раку є PI3-кіназа I класу, що містить p110 α , на що вказують неодноразово повторювані онкогенні мутації в p110 α (Samuels et al. (2004) *Science*, 304: 554; US 5824492; US 5846824; US 6274327). Інші ізоформи можуть відігравати важливу роль при раку і також залучені в серцево-судинні та імунозапальні захворювання (Workman P (2004) *Biochem. Soc. Trans.*, 32: 393-396; Patel et al. (2004) *Proc. Am. Assoc. of Cancer Res. (Abstract LB-247)* 95th Annual Meeting, March 27-31, Orlando, Florida, USA; Ahmadi K. and Waterfield M.D. (2004) "Phosphoinositide 3-Kinase: Function and Mechanisms" *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz W.J., Lane M.D. eds) Elsevier/Academic Press). Онкогенні мутації p110 α (альфа) зі значною частотою були виявлені в солідних пухлинах товстої кишки, молочної залози, головного мозку, печінки, яєчників, шлунка, легень і голови і шиї. Приблизно 35-40 % випадків ракових пухлин молочної залози, позитивних відносно рецепторів гормонів (HR+), містять мутацію в PIK3CA. Порушення в PTEN виявляються при гліобластомі, меланомі, раку передміхурової залози, ендометрія, яєчників, молочної залози, легень, голови і шиї, гепатоклітинному раку і раку щитовидної залози.

PI3-кіназа (PI3K) являє собою гетеродимер, що складається з субодиниць p85 і p110 (Otsu et al. (1991) *Cell*, 65: 91-104; Hiles et al. (1992) *Cell*, 70: 419-29). Було ідентифіковано чотири різних PI3KI класи, позначених як PI3K- α (альфа), - β (бета), - δ (дельта) і - γ (гамма), кожна з яких містить індивідуальну каталітичну субодиницю з MM 110 кДа і регуляторну субодиницю. Кожна з трьох каталітичних субодиниць, тобто p110-альфа, p110-бета і p110-дельта, взаємодіє з однією і тією ж регуляторною субодиницею, p85; тоді як p110-гамма взаємодіє з іншою регуляторною субодиницею, p101. Картини експресії для кожної з цих PI3K в клітинах і тканинах людини розрізняються. У разі кожного з підтипів PI3K, альфа, бета і дельта, субодиниця p85 діє таким чином, щоб локалізувати PI3-кіназу в плазматичній мембрані за допомогою взаємодії її SH2-домену з фосфорильованими залишками тирозину (наявними у відповідному оточенні послідовностей) в білках-мішенях (Rameh et al. (1995) *Cell*, 83: 821-30; Volinia et al. (1992) *Oncogene*, 7: 789-93).

Шлях PI3-кіназа/Akt/PTEN є привабливою мішенню для розробки протиракових лікарських засобів, оскільки очікується, що такі агенти будуть інгібувати клітинну проліферацію, придушувати сигнали від стромальних клітин, що забезпечують раковим клітинам виживання і хіміорезистентність, реверсувати придушення апоптозу і долати внутрішню резистентність ракових клітин до цитотоксичних агентів. PI3K активується в результаті включення опосередкованого рецепторними тирозинкіназами сигнального шляху, а також активуючих мутацій в каталітичній субодиниці p110 PI3K, втрати функціональності онкосупресора PTEN або в результаті активуючих мутацій в AKT, що рідко зустрічаються.

Таселісіб (GDC-0032, Roche RG7604, реєстраційний № в Хімічній реферативній службі (CAS) 1282512-48-4, Genentech Inc.) з назвою 2-(4-(2-(1-ізопропіл-3-метил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)-1H-піразол-1-іл)-2-метилпропанамід має сильну активність відносно PI3K (Ndubaku C.O. et al. (2013) *J. Med. Chem.*, 56: 4597-4610; WO 2011/036280; US 8242104; US 8343955), і в даний час проходять його дослідження на пацієнтах з локально поширеними або метастатичними солідними пухлинами. Таселісіб (GDC-0032) являє собою помірний інгібітор каталітичної субодиниці бета-ізоформи PI3K, в 31 разів більше селективної відносно альфа-субодиниці в порівнянні з бета-субодиницею. Таселісіб проявляє більш високу селективність до мутантних ізоформ PI3K α , ніж по відношенню до PI3K α дикого типу (Olivero A.G. et al., AACR 2013. Abstract DDT02-01). В даний час таселісіб розробляється з метою лікування пацієнтів з діагнозом рецептор естрогену (ER) позитивного, HER2 (від англ. human epidermal growth factor receptor 2 - рецептор епідермального фактора росту людини 2 типу) - негативного метастатичного раку молочної залози (mBC, metastatic breast cancer) і недрібноклітинного раку легені (NSCLC, non-small cell lung cancer). У дослідженні на фазі Ia з використанням єдиного агента таселісибу спостерігали часткові відповіді (PR, partial responses) у 6/34 включених в дослідження пацієнтів. Всі 6 відповідей спостерігали у пацієнтів, що мають пухлини з мутацією в PIK3CA (Juric D. et al. AACR, 2013), що вказує на необхідність визначення PIK3CA-мутаційного статусу для пацієнтів, що піддаються лікуванню таселісібом.

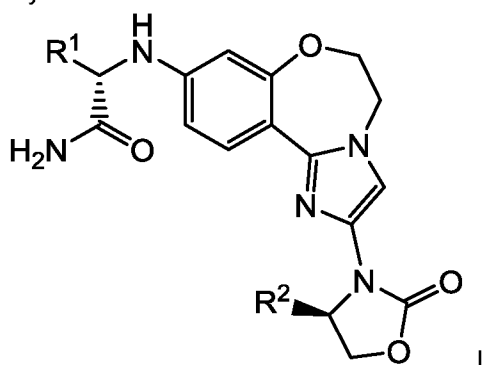
Завдяки нещодавно одержаним клінічним даним з використанням інгібіторів PI3K відзначено участь активності PI3K-дельта в якості джерела шлунково-кишкових токсичних ефектів (Akinleye et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics", Journal of Hematology & Oncology, 2013, 6: 88-104; C. Saura et al., "Phase Ib Study of the PI3K Inhibitor Taselisib (GDC-0032) in Combination with Letrozole in Patients with Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer", San Antonio Breast Cancer Symposium - December 12, 2014, PD5-2; Lopez et al., "Taselisib, a selective inhibitor of PIK3CA, is highly effective on PIK3CA-mutated and HER2/neu amplified uterine serous carcinoma in vitro and in vivo", (2014) Gynecologic Oncology).

Іделалісіб (GS-1101, CAL-101, ZYDELIG®, Gilead Sciences Inc., реєстраційний № в CAS 870281-82-6, 5-фтор-3-феніл-2-[(1S)-1-(7H-пурин-6-іламіно)пропіл]-4(3H)-хіназолінон) являє собою селективний інгібітор PI3Kδ (дельта) і схвалений до застосування для лікування хронічного лімфоїдного лейкозу, CLL (Somoza J.R. et al. (2015) J. Biol. Chem., 290: 8439-8446; US 6800620; US 6949535; US 8138195; US 8492389; US 8637533; US 8865730; US 8980901; RE44599; RE44638). Серед самих загальновідомих несприятливих подій після лікування іделалісібом, відзначають діарею і коліт (Brown et al. "Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110δ, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia" (2014) Blood, 123(22): 3390-3397; інструкція по застосуванню препарату Zydelig®, 2014; інформаційний бюлетень REMS (Risk Evaluation and Mitigation Strategy - Стратегія оцінки і зниження ризиків) для Zydelig®). Істотні шлунково-кишкові (ШК) токсичні ефекти, виявлені після лікування іделалісібом, не суперечать гіпотезі про те, що інгібування PI3Kδ (дельта) є джерелом шлунково-кишкових токсичних ефектів. Додаткові серйозні побічні ефекти спостерігали при клінічних випробуваннях іделалісібу (Zydelig®) в комбінації з іншими терапіями. Несприятливі події, включаючи випадки смерті, були пов'язані з такими інфекціями, як пневмонія. У березні 2016 року Комітет по оцінці фармаконадзорних ризиків (PRAC, Pharmacovigilance Risk Assessment Committee) Європейського агентства з лікарських засобів (EMA) опублікував попередню попереджувальну інформацію і рекомендацію для пацієнтів щодо необхідності поєднання лікування антибіотиками з постійним моніторингом наявності інфекції при прийомі зиделігу (іделалісібу). У березні 2016 року Управління з контролю якості харчових продуктів і лікарських засобів США опублікувало повідомлення, що "шість клінічних випробувань по дослідженню іделалісібу (Zydelig®) в комбінації з іншими терапіями, були зупинені через появу повідомлень про збільшення числа несприятливих подій, включаючи смерть".

Існує потреба в додаткових модуляторах PI3Kα, корисних для лікування ракових захворювань, зокрема, в інгібіторі PI3Kα, який вибірково впливає на пухлини, що експресують мутантну PI3Kα, в порівнянні з клітинами, експресуючими немутантну PI3Kα. Існує особлива потреба в такому агенті, який вибірково інгібує ізоформу PI3Kα в порівнянні з ізоформами PI3Kβ, PI3Kδ і PI3Kγ, що, як очікується, приведе до розширення терапевтичного вікна.

Суть винаходу

Даний винахід в цілому відноситься до сполук бензоксазепіноксазолідинонів з активністю, виборчою стосовно модулювання мутантних форм ізоформи PI3Kα (альфа), і мають структуру формули I:



і стереоізомерів, геометричних ізомерів, таутомерів та їх фармацевтично прийнятних солей. Різні замісники є такими, як визначено в даному описі.

Інший аспект винаходу відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить сполуку з сімейства бензоксазепіноксазолідинонів формули I і фармацевтично прийнятний носій, речовину, що сприяє ковзанню, розчинник або ексципієнт.

Інший аспект винаходу стосується способу лікування раку у пацієнта, що має діагноз рак, який включає введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки з сімейства бензоксазепіноксазолідинонів формули I.

Інший аспект винаходу відноситься до набору для терапевтичного лікування раку молочної залози, який містить:

- а) сполуку з сімейства бензоксазепіноксазолідинонів формули I; і
- б) інструкції із застосування в терапевтичному лікуванні раку молочної залози.

5 Короткий опис графічних матеріалів

На Фіг. 1 показані одержані з використанням рентгенівського випромінювання спільні кристалічні структури PI3Kα з: А) таселісидом (GDC-0032), В) сполукою 529 з US 8242104, С) сполукою 101 і D) сполукою 103.

10 На Фіг. 2 показані одержані з використанням рентгенівського випромінювання спільні кристалічні структури PI3Kα з: А) таселісидом (GDC-0032) і В) сполукою 101.

На Фіг. 3А показані дані вестерн-блот з зображенням рівнів p110α (p110a, p110 альфа) через 24 години після обробки сполукою 101, сполукою 103 і сполукою 436 з US 8242104, клітин HCC-1954 (з мутацією H1047R в PI3Kα).

15 На Фіг. 3В показані дані вестерн-блоттингу з зображенням рівнів p110α (p110a, p110 альфа) через 24 години після обробки сполукою 101, сполукою 103 і сполукою 436 з US 8242104 клітин HDQ-P1 (PI3Kα дикого типу).

Детальний опис ілюстративних варіантів здійснення

Тепер буде приведена докладне посилання на деякі втілення винаходу, приклади яких ілюструються супроводжуючими структурами і формулами. Незважаючи на те, що винахід буде описано в поєднанні з наведеними втіленнями, очевидно, що винахід не передбачає обмеження цими втіленнями. Навпаки, мається на увазі, що даний винахід охоплює всі альтернативні варіанти, модифікації і еквіваленти, які можуть бути включені в об'єм даного винаходу, визначений формулою винаходу. Фахівцю в даній області техніки будуть відомі багато способів і матеріалів, аналогічні або еквівалентні викладеним в даному описі, які можуть бути використані при практичному застосуванні даного винаходу. Даний винахід жодним чином не обмежено описаними способами і матеріалами. У тому випадку, якщо в одному або більше ніж одному з включених літературних джерел, патентів і аналогічних матеріалів є відмінність від цієї заявки або протиріччя з даною заявою, включаючи, але не обмежуючись цим, визначені терміни, вживання термінів, описані методи чи щось таке, то дана заявка є контрольним документом. Якщо не вказано інше, то всі технічні та наукові терміни, використані в даному описі, мають значення, що зазвичай розуміється середнім фахівцем в області техніки, до якої даний винахід відноситься. Незважаючи на те, що при практичному застосуванні або тестуванні даного винаходу можуть бути використані способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні таким, як описані в даній заявці, відповідні способи і матеріали описані нижче. Всі публікації, патентні заявки, патенти та інші посилання, згадані в даному описі, включені за допомогою посилання у всій своїй повноті. Використана в цій заявці номенклатура ґрунтується на систематичній номенклатурі IUPAC (Міжнародний союз з теоретичної та прикладної хімії), якщо не вказано інше.

Визначення

40 При зазначенні числа замісників термін "один або більше" відноситься до діапазону від одного замісника до самого найбільш можливого числа замісників, тобто від заміни одного атома водню до заміни включно всіх атомів водню на замісники. Термін "замісник" означає атом або групу атомів, які замінюють атом водню у вихідній молекулі. Термін "заміщений" означає, що конкретна група має один або декілька замісників. Якщо будь-яка група може мати кілька замісників і запропонований ряд можливих замісників, то такі замісники вибрані незалежно і необов'язково будуть однаковими. Термін "незаміщений" означає, що конкретна група не має ніяких замісників. Термін "заміщений" означає, що конкретна група є вакантною або заміщена одним або декількома замісниками, незалежно вибраними з групи можливих замісників. При вказівці числа замісників термін "один або більше" означає заміну на замісники в кількості від одного замісника до самого найбільш можливого числа замісників, тобто заміну від одного атома водню до заміни включно всіх атомів водню на замісники.

Термін "алкіл", використаний в даному описі, відноситься до насиченого лінійного або розгалуженого одновалентного вуглеводневого радикалу з одного-дванадцяти атомів вуглецю (C₁-C₁₂), причому цей алкільний радикал можливо може бути незалежно заміщений одним або декількома замісниками, описаними нижче. В іншому втіленні алкільний радикал містить від одного до восьми атомів вуглецю (C₁-C₈) або від одного до шести атомів вуглецю (C₁-C₆). Приклади алкільних груп включають, але не обмежуються цим, метил (Me, -CH₃), етил (Et, -CH₂CH₃), 1-пропіл (n-Pr, -CH₂CH₂CH₃), 2-пропіл (i-Pr, ізопропіл, -CH(CH₃)₂), 1-бутил (n-Bu, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-метил-1-пропіл (i-Bu, ізобутил, -CH₂CH(CH₃)₂),

2-бутил (втор-*Bu*, втор-бутил, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-метил-2-пропіл (*t-Bu*, трет-бутил, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-пентил (н-пентил, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-метил-2-бутил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-метил-2-бутил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-метил-1-бутил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-метил-1-бутил ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1-гексил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-гексил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-гексил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$), 2-метил-2-пентил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-метил-2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4-метил-2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-метил-3-пентил ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-метил-3-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,3-диметил-2-бутил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,3-диметил-2-бутил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-гептил, 1-октил і тому подібне.

Терміни "карбоцикл", "карбоцикліл", "карбоциклічне кільце" і "циклоалкіл" відносяться до одновалентного неароматичного, насиченого або частково ненасиченого кільця, що має від 3 до 12 атомів вуглецю ($\text{C}_3\text{-C}_{12}$) у вигляді моноциклічного кільця або від 7 до 12 атомів вуглецю у вигляді біциклічного кільця. Біциклічні карбоцикли, що мають від 7 до 12 атомів, можуть бути організовані, наприклад, у вигляді біцикло-[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- або -[6,6]-систем, а біциклічні карбоцикли, що мають 9 або 10 атомів в кільці, можуть бути організовані у вигляді біцикло-[5,6]- або -[6,6]-систем або у вигляді місточкових систем, таких як біцикло[2.2.1]гептан, біцикло[2.2.2]октан і біцикло[3.2.2]нонан. Спіро-карбоциклільні угруповання також включені в об'єм даного визначення. Приклади спіро-карбоциклільних угруповань включають [2.2]пентаніл, [2.3]гексаніл і [2.4]гептаніл. Приклади моноциклічних карбоциклів включають, але не обмежуються цим, циклопропіл, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-еніл, 1-циклопент-2-еніл, 1-циклопент-3-еніл, циклогексил, 1-циклогекс-1-еніл, 1-циклогекс-2-еніл, 1-циклогекс-3-еніл, циклогексادیєніл, циклогептил, циклооктил, циклононіл, циклодецил, циклоундецил, циклододецил і тому подібне. Карбоциклільні групи можливо незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними в даній заявці.

"Арил" означає одновалентний ароматичний вуглеводневий радикал з 6-20 атомів вуглецю ($\text{C}_6\text{-C}_{20}$), утворений в результаті видалення одного атома водню від єдиного атома вуглецю вихідної ароматичної кільцевої системи. Деякі арильні групи представлені в наведених в якості прикладу структурах як "Ar". Арил включає біциклічні радикали, що містять ароматичне кільце, конденсоване з насиченим, частково ненасиченим кільцем або ароматичним карбоциклічним кільцем. Типові арильні групи включають, але не обмежуються цим, радикали, що утворюються з бензолу (феніл), заміщених бензолів, нафталіну, антрацену, біфенілу, інденілу, інданілу, 1,2-дигідронафталіну, 1,2,3,4-тетрагідронафтилу і тому подібне. Арильні групи можливо незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними в даній заявці.

Терміни "гетероцикл", "гетероцикліл" і "гетероциклічне кільце" використовуються в даному описі взаємозамінно і відносяться до насиченого або частково ненасиченого (тобто має один або кілька подвійних та/або потрійних зв'язків в межах кільця) карбоциклічного радикалу, що містить від 3 до приблизно 20 атомів в кільці, при цьому щонайменше один атом в кільці є гетероатомом, що вибирають з атомів азоту, кисню, фосфору і сірки, а інші атоми в кільці є атомами С, причому один або кілька атомів в кільці можливо незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними нижче. Гетероцикл може являти собою моноцикл, який має від 3 до 7 членів в кільці (від 2 до 6 атомів вуглецю і від 1 до 4 гетероатомів, вибраних з N, O, P і S), або біцикло, що має від 7 до 10 членів в кільці (від 4 до 9 атомів вуглецю і від 1 до 6 гетероатомів, вибраних з N, O, P і S), наприклад: біцикло-[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- або -[6,6]-систему. Гетероцикли описані в Paquette Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), особливо в главах 1, 3, 4, 6, 7 і 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, з 1950 року по теперішній час), зокрема, в томах 13, 14, 16, 19 і 28; та в J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566. Термін "гетероцикліл" також включає в себе радикали, при цьому гетероциклічні радикали конденсовані з насиченим, частково ненасиченим кільцем або ароматичним карбоциклічним або гетероциклічним кільцем. Приклади гетероциклічних кілець включають, але не обмежуються цим, морфолін-4-іл, піперидин-1-іл, піперазиніл, піперазин-4-іл-2-он, піперазин-4-іл-3-он, піролідін-1-іл, тіоморфолін-4-іл, S-діоксотіоморфолін-4-іл, азокан-1-іл, азетидин-1-іл, октагідропіридо[1,2-а]піразин-2-іл, [1,4]діазепан-1-іл, піролідиніл, тетрагідрофураніл, дигідрофураніл, тетрагідротієніл, тетрагідропіраніл, дигідропіраніл, тетрагідротіопіраніл, піперидино, морфоліно, тіоморфоліно, тіоксаніл, піперазиніл, гомопіперазиніл, азетидиніл, оксетаніл, тіетаніл, гомопіперидиніл, оксепаніл, тіепаніл, оксазепініл, діазепініл, тіазепініл, 2-піролініл, 3-піролініл, індолініл, 2H-піраніл, 4H-піраніл, діоксаніл, 1,3-діоксоланіл, піразолініл, дитаніл, дитіоланіл, дигідропіраніл, дигідротієніл, дигідрофураніл, піразолідиніл, імідазолініл,

імідазолідиніл, 3-азабіцикло[3.1.0]гексаніл, 3-азабіцикло[4.1.0]гептаніл, азабіцикло[2.2.2]гексаніл, 3H-індоліл, хінолізиніл і N-піридилсечовини. Спіро-гетероциклічні угруповання також включені в об'єм даного визначення. Приклади спіро-гетероциклічних угруповань включають азаспіро[2.5]октаніл і азаспіро[2.4]гептаніл. Прикладами гетероциклічної групи, де 2 атоми в кільці заміщені угрупованнями оксо (= O), є піримідиноіл і 1,1-діоксо-тіоморфолініл.

Термін "гетероарил" відноситься до одновалентного ароматичного радикалу, що складається з 5-, 6- або 7-членних кілець, і включає в себе конденсовані кільцеві системи (щонайменше одне з кілець в яких є ароматичним) з 5-20 атомів, що містять один або кілька гетероатомів, незалежно вибраних з атомів азоту, кисню і сірки. Прикладами гетероарильних груп є піридиніл (включаючи, наприклад, 2-гідроксипіридиніл), імідазоліл, імідазопіридиніл, піримідиніл (включаючи, наприклад, 4-гідроксипіримідиніл), піразоліл, триазоліл, піразиніл, тетразоліл, фурил, тієніл, ізоксазоліл, тіазоліл, оксадіазоліл, оксазоліл, ізотіазоліл, піроліл, хінолініл, ізохінолініл, тетрагідроізохінолініл, індоліл, бензімідазоліл, бензофураніл, циннолініл, індазоліл, індолізиніл, фталазиніл, піридазиніл, триазиніл, ізоіндоліл, птеридиніл, пуриніл, оксадіазоліл, триазоліл, тіадіазоліл, фуразаніл, бензофуразаніл, бензотіофеніл, бензотіазоліл, бензоксазоліл, хіназолініл, хіноксалініл, нафтиридиніл і фуропіридиніл.

Терміни "лікувати" і "лікування" відносяться до терапевтичного лікування, при якому у об'єкта повинно бути ослаблене (полегшене) небажане фізіологічне змінення або розлад, такі як розвиток або поширення артриту або раку. Для цілей даного винаходу корисні або бажані клінічні результати включають, але не обмежуються цим, полегшення симптомів, зменшення ступеня захворювання, стабільний (тобто без погіршення) стан захворювання, затримку або уповільнення прогресування захворювання, зменшення інтенсивності симптомів або тимчасове полегшення хворобливого стану і ремісію (будь то часткову або повну), як детектовані, так і недетектовані. "Лікування" також може означати продовження виживання в порівнянні з очікуваним виживанням за відсутності отримання лікування. Особи, які потребують такого лікування, включають такий стан або розлад, що вже існують.

Фраза "терапевтично ефективна кількість" означає кількість сполуки за даним винаходом, яка (1) лікує конкретне захворювання, стан або розлад, (2) послаблює, зменшує інтенсивність або усуває один або більше симптомів конкретного захворювання, стану або розладу або (3) запобігає або затримує початок розвитку одного або більше симптомів конкретного захворювання, стану або розладу, описаного в даній заявці. У разі раку терапевтично ефективну кількість лікарського засобу може зменшувати кількість ракових клітин; зменшувати розмір пухлини; інгібувати (тобто сповільнювати до деякої міри і переважно зупиняти) інфільтрацію ракових клітин в периферичні органи; інгібувати (тобто сповільнювати до деякої міри і переважно зупиняти) пухлинний метастаз; інгібувати до деякої міри пухлинний ріст; та/або послаблювати до деякої міри один або більше симптомів, асоційованих з раком. Залежно від можливості лікарського засобу запобігатиме зростанню та/або знижувати існуючі ракові клітини, воно може бути цитостатичним та/або цитотоксичним. Що стосується терапії раку, то ефективність може бути виміряна, наприклад, шляхом оцінки часу до прогресування захворювання (TTP) та/або визначення коефіцієнта відповіді (RR).

Термін "рак" відноситься до фізіологічного стану або описує фізіологічний стан у ссавців, яке зазвичай характеризується нерегульованим клітинним ростом. Термін "пухлина" має на увазі наявність одного або більше типів ракових клітин. Приклади раку включають, але не обмежуються цим, карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкоз або лімфолейкози. Більш конкретні приклади таких видів раку включають плоскоклітинний рак (наприклад, плоскоклітинний рак епітеліальної тканини), рак легені, в тому числі дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені ("NSCLC"), аденокарциному легені і плоскоклітинний рак легені, рак очеревини, гепатоклітинний рак, рак шлунково-кишкового тракту або шлунка, в тому числі гастроінтестинальний рак, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак прямої кишки, колоректальний рак, рак ендометрія або матки, рак слинних залоз, рак нирки або нирковий рак, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, печінковий рак, анальний рак, рак пеніса, а також рак голови і шиї.

"Гематологічні злоякісні новоутворення" (британське написання "haematological" відрізняється від прийнятого в США написання "hematological") представляють собою типи раку, які впливають на кров, кістковий мозок і лімфатичні вузли. Оскільки ці три системи тісно пов'язані через імунну систему, то захворювання, що зачіпає одну з них, в рівній мірі часто буде зачіпати і інші: незважаючи на те, що лімфома є захворюванням лімфатичних вузлів, часто вона поширюється в кістковий мозок, впливаючи на кров. Гематологічні злоякісні новоутворення

являють собою злоякісні неоплазії ("рак"), і як правило їх лікують фахівці в області гематології та/або онкології. У деяких центрах "гематології/онкології" відносять до однієї з вузьких спеціалізацій терапії внутрішніх хвороб, тоді як в інших вважають окремими підрозділами (маються також фахівці в області хірургічної і радіаційної онкології). Не всі гематологічні розлади є злоякісними ("раковими"); допомога при цих інших захворюваннях крові також може бути надана гематологом. Гематологічні злоякісні новоутворення можуть виникати з будь-якої з двох основних ліній клітин крові: ліній мієлоїдних і лімфоїдних клітин. Лінія мієлоїдних клітин зазвичай продукує гранулоцити, еритроцити, тромбоцити, макрофаги і гладкі клітини; лінія лімфоїдних клітин продукує В-, Т-, НК-клітини (природні кілерні клітини) і плазматичні клітини. Лімфоми, лімфоцитарні лейкози і мієлома відбуваються з лімфоїдній лінії, в той час як гострий і хронічний мієлогенний лейкоз, мієлодиспластичні синдроми і мієлопроліферативні розлади мають мієлоїдне походження. Лейкози включають гострий лімфобластний лейкоз (ALL, acute lymphoblastic leukemia), гострий мієлогенний лейкоз (AML, acute myelogenous leukemia), хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL, chronic lymphocytic leukemia), хронічний мієлогенний лейкоз (CML, chronic myelogenous leukemia), гострий моноцитарний лейкоз (AMOL, acute monocytic leukemia) і дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому (SLL, small lymphocytic lymphoma). Лімфоми включають лімфоми Ходжкіна (всі чотири підтипи) і неходжкінські лімфоми (NHL (Non-Hodgkin's lymphoma), всі підтипи).

"Хіміотерапевтичний агент" являє собою хімічну сполуку, корисну в лікуванні раку, незалежно від механізму дії. Класи хіміотерапевтичних агентів включають, але не обмежуються цим: алкілюючі агенти, антиметаболіти, алкалоїди рослинного походження, що є "веретеними отрутами", цитотоксичні/протиопухлинні антибіотики, інгібітори топоізомерази, антитіла, фотосенсибілізуючі речовини та інгібітори кіназ. Хіміотерапевтичні агенти включають сполуки, які використовуються в "терапії спрямованої дії" і традиційній хіміотерапії. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають: ібрутиніб (IMBRUVICA™, APCI-32765, Pharmacyclics Inc./Janssen Biotech Inc.; реєстраційний № в CAS 936563-96-1, US 7514444), іделалісіб (раніше званий CAL-101, GS 1101, GS-1101, Gilead Sciences Inc.; реєстраційний № в CAS 1146702-54-6), ерлотиніб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, реєстраційний № в CAS 51-21-8), гемцитабін (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (№ в CAS 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (Platinol®, (SP-4-2)-діаміндихлорплатину(II), цис-діамін, дихлорплатину(II), № в CAS 15663-27-1), карбоплатин (№ в CAS 41575-94-4), паклітаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломід (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабіцикло[4.3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамід, № в CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенілбут-1-еніл)фенокс]-N,N-диметилетанамін, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) і доксорубіцин (ADRIAMYCIN®, № в CAS 23214-92-8, Akti-1/2 (інгібітор Akt-1/2), HPPD (оксим 5-(1-(2-гідроксіетил)-3-(піридин-4-іл)-1H-піразол-4-іл)-2,3-дигідро-1H-інден-1-ону) і рапаміцин.

Хіміотерапевтичні агенти включають інгібітори мішеней В-клітинних рецепторів, такі як інгібітори BTK (тирозинкіназа Брутона), Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 - В-клітинна лімфома 2) і JAK (янус-кіназа).

Інші приклади хіміотерапевтичних агентів включають: оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезоміб (VELCADE®, Millennium Pharm.), сутент (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), іматинібу мезилат (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (інгібітор Mek (Mitogen-activated protein kinase kinase - кіназа мітоген-активованої протеїнкінази), Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (інгібітор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (інгібітор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (інгібітор PI3K, Novartis), XL-147 (інгібітор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолінова кислота), рапаміцин (сиролімус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиніб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарніб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафеніб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), рефітиніб (IRESSA®, AstraZeneca), іринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), типіфарніб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (без кремофору), препарати наночастинок паклітакселу, сконструйованих з використанням альбуміну (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), вандетаніб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролімус (TORISEL®, Wyeth), пазопаніб (GlaxoSmithKline), канфосфамід (TELCYTA®, Telik), тіотепа і циклофосфамід (CYTOXAN®, NEOSAR®); алкілсульфонати, такі як бусульфат, імпросульфат і піпосульфат; азиридины, такі як бензодоба, карбоксон, метуредоба і уредоба; етиленіміни і метиламеламіни, в тому числі алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилмеламін; ацетогеніни (особливо

буллатацин і буллатацинон); камптотецин (в тому числі синтетичний аналог топотекан); бріостатин; каллістатин; CC-1065 (в тому числі його синтетичні аналоги адозелезин, карзелезин і бізелезин); криптофіцини (зокрема, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (в тому числі синтетичні аналоги, KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктійн; спонгістатин; азотчасті іприти, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид мехлоретаміноксиду, мелфалан; новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урациловий іприт; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, каліхеаміцин гамма 1I, каліхеаміцин омега 1I (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186); динеміцин, динеміцин А; бісфосфонати, такі як клодронат; еспераміцин; а також неокарцинонстатинний хромофор і споріднені хромофори хромопротейнових енедіїнових антибіотиків), аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карцинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-піроліно-доксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епирубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, неморубіцин, марцелломіцин, митоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолову кислоту, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, порфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурину, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолону пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; антиадренергічні засоби, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; засіб для заповнення фолієвої кислоти такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамідглікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едатраксат; дефосфамін; демеколцин; діазиквон; елфорнітин; еліптіцію ацетат; епотилон; етоглуцид; галлію нітрат; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнин; майтансиноїди, такі як майтансин і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; подофілінову кислоту; 2-етилгідрозид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонову кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецени (особливо, токсин Т-2, верракурин А, роридин А і ангуїдин); уретан; віндезин; дакарбазин; манномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); циклофосфамід; тіотепа; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкристин; вінорелбін (NAVELBINE®); новантрон; теніпозид; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; капецитабін (XELODA®, Roche); ібандронат; CPT-11; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноева кислота; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти і похідні будь-якого зі згаданого вище.

У визначення "хіміотерапевтичного агента" також включені: (1) антигормональні агенти, дія яких полягає в регуляції або інгібуванні впливу гормонів на пухлини, як наприклад, антиестрогени і селективні модулятори рецепторів естрогенів (SERM, selective estrogen receptor modulator), в тому числі, наприклад, тамоксифен (включаючи NOLVADEX®; тамоксифену цитрат), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, FARESTON® (тореміфіну цитрат) і селективні негативні регулятори рецепторів естрогенів (SERD, selective estrogen receptor down-regulator), такі як фулвестрант (FASLODEX®, Astra Zeneca); (2) інгібітори ароматази, інгібуючих фермент ароматазу, яка регулює утворення естрогенів в надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, MEGASE® (мегестролу ацетат), AROMASIN® (екземестан; Pfizer), форместан, фадрозол, RIVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол; Novartis) і ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (3) антиандрогени, такі як флутамід, нилутамід, бікалутамід, лейпролід і гозерелін; а також троксацитабін (1,3-діоксолановий аналог нуклеозиду цитозину); (4) інгібітори протеїнкіназ, такі як інгібітори MEK, наприклад, кобіметиніб (WO 2007/044515); (5) інгібітори ліпідних кіназ, такі як таселісіб (GDC-0032, Genentech Inc.); (6) антисмислові олігонуклеотиди, зокрема такі, що інгібують експресію генів в сигнальних шляхах, що беруть участь в аберантній проліферації клітин, наприклад, PKC-альфа (протеїнкіназа C), Raf і H-Ras, такі як облімерсен (GENASENSE®, Genta Inc.); (7) рибозими, такі як інгібітори експресії VEGF (судинний ендотеліальний фактор росту) (наприклад, ANGIOZYME®) та інгібітори експресії HER2; (8) вакцини, як наприклад, генотерапевтичні вакцини, наприклад, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® і VAXID®; rIL-2

(рекомбінантний інтерлейкін-2) PROLEUKIN®; інгібітори топоізомерази 1, такі як LURTOTECAN®; rnrH ABARELIX®; (9) антиангіогенні агенти, такі як бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти і похідні будь-якого з зазначеного вище.

У визначення "хіміотерапевтичного агента" також включені терапевтичні антитіла, такі як алемтузумаб (Кемпас (англ. - campath)), бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панітумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб (PERJETA™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), трастузумабу емтанзин (KADCYLA®, Genentech Inc.) і тозитумомаб (бексар (bexxar), Corixa).

Термін "метаболіт" відноситься до продукту, утвореному в процесі метаболізму конкретної сполуки або її солі в організмі. Метаболіти сполуки можуть бути ідентифіковані з використанням загальноприйнятих методик, відомих в даній області техніки, а їх активності визначені з використанням таких тестів, які викладені в даному описі. Такі продукти можуть виходити із сполуки, що вводиться, наприклад, в результаті її окислення, відновлення, гідролізу, амідування, дезамідування, етерифікації, деетерифікації, ферментативного розщеплення і тому подібного. Відповідно, винахід включає метаболіти сполук за винаходом, в тому числі сполуки, одержувані способом, що включає приведення сполуки формули I за даним винаходом в контакт з ссавцем протягом періоду часу, достатнього для одержання продукту його метаболізму.

Термін "інструкція із застосування" зазвичай відноситься до інструкцій, що традиційно включаються в промислові упаковки терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, протипоказання та/або попередження щодо застосування таких терапевтичних продуктів.

Термін "хіральний" відноситься до молекул, які мають властивість не збігатися при накладенні на дзеркально відображеного партнера, тоді як термін "ахіральний" відноситься до молекул, що збігаються при накладенні на свого дзеркально відображеного партнера.

Термін "стереоізомери" відноситься до сполук, які мають ідентичний хімічний склад, але різняться розташуванням атомів або груп у просторі.

"Діастереомер" відноситься до стереоізомерів з двома або більше центрами хіральності, і такі молекули не є дзеркальними відображеннями одно одної. Діастереомери мають різні фізичні властивості, наприклад точки плавлення, точки кипіння, спектральні властивості та реакційні здатності. Суміші діастереомерів можна розділити за допомогою аналітичних методик з високою роздільною здатністю, таких як електрофорез і хроматографія.

Термін "енантіомери" відноситься до двох стереоізомерів сполуки, які не збігаються з дзеркальними відображеннями одне одного.

В даному описі в основному використані стереохімічні визначення і правила, представлені в S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984), McGraw-Hill Book Company, New York; і Eliel E. and Wilen S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Сполуки за винаходом можуть містити асиметричні або хіральні центри і з огляду на це існувати в різних стереоізомерних формах. Передбачається, що всі стереоізомерні форми сполук за даним винаходом, включаючи, але не обмежуючись цим, діастереомери, енантіомери і атропізомери, а також їх суміші, такі як рацемічні суміші, становлять частину винаходу. Багато органічних сполук існують в оптично активних формах, тобто вони мають здатність обертати площину плоскополяризованого світла. При описі оптично активної сполуки для позначення абсолютної конфігурації молекули відносно її хіральних центру(ів) використовують префікси D і L або R і S. Для позначення знака напрямку обертання плоскополяризованого світла сполукам застосовують префікси d та l або (+) і (-), при цьому (-) або l означає, що сполука є лівообертальною. Сполука з префіксом (+) або d є правообертальною. Для даної хімічної структури ці стереоізомери є ідентичними, за винятком того, що вони є дзеркальними відображеннями один одного. Конкретний стереоізомер також може бути визначений як енантіомер, і суміш таких ізомерів часто називають енантіомерною сумішшю. Суміш із співвідношенням енантіомерів 50:50 називається рацемічною сумішшю або рацематом, що може утворюватися, якщо не дотримувалося ніякої стереовибірковості або стереоспецифічності в хімічній(ому) реакції або процесі. Терміни "рацемічну суміш" і "рацемат" відносяться до еквімолярної суміші двох енантіомерних різновидів, що не володіють оптичною активністю. Енантіомери можна виділити окремо з рацемічної суміші методом хірального розподілення, таким як надкритична рідинна хроматографія (SFC). Присвоєння конфігурації при хіральних центрах в розділених енантіомерах може бути орієнтовним і відображено в структурах, які у Таблиці 1 з метою ілюстрації, тоді як стереохімічна конфігурація є однозначно установленною, наприклад, за даними рентгеноструктурного аналізу кристалів.

Термін "таутомер" або "таутомерна форма" відноситься до структурних ізомерів, що володіють різною енергією, взаємоперетворення яких протікає через низький енергетичний бар'єр. Наприклад, протонні таутомери (також відомі як прототропні таутомери) характеризуються взаємоперетворенням в результаті міграції протона, як наприклад при кето-енольній та імін-енамінній ізомерії. Валентні таутомери включають взаємоперетворення за допомогою реорганізації деяких з зв'язуючих електронів.

Термін "фармацевтично прийнятні солі" означає солі, які не є небажаними ні в біологічному, ні в інших відношеннях. Фармацевтично прийнятні солі включають як кислотні-адитивні солі, так і основно-адитивні солі. Фраза "фармацевтично прийнятні" вказує на те, що речовина або композиція повинні бути сумісні хімічно та/або токсикологічно з іншими інгредієнтами, що входять до складу композиції, та/або з ссавцями, що піддаються лікуванню ними.

Термін "фармацевтично прийнятна кислотна-адитивна сіль" означає такі фармацевтично прийнятні солі, які утворюються з неорганічними кислотами, такими як соляна кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, вугільна кислота, фосфорна кислота, і органічними кислотами, вибраними з класів аліфатичних, циклоаліфатичних, ароматичних, арил-аліфатичних, гетероциклічних, карбонових і сульфонових органічних кислот, таких як мурашина кислота, оцтова кислота, пропіонова кислота, гліколева кислота, глюконова кислота, молочна кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, яблучна кислота, малеїнова кислота, малінова кислота, бурштинова кислота, фумарова кислота, винна кислота, лимонна кислота, аспарагінова кислота, аскорбінова кислота, глютамінова кислота, антранілова кислота, бензойна кислота, корична кислота, мигдальна кислота, ембонова кислота, фенілоцтова кислота, метансульфонова кислота ("мезилат"), етансульфонова кислота, паратолуолсульфонова кислота і саліцилова кислота.

Термін "фармацевтично прийнятна основно-адитивна сіль" означає такі фармацевтично прийнятні солі, які утворюються з органічною або неорганічною основою. Приклади прийнятих солей з неорганічними основами включають солі натрію, калію, амонію, кальцію, магнію, заліза, цинку, міді, марганцю та алюмінію. Солі, що утворюються з фармацевтично прийнятих органічних нетоксичних основ, включають солі первинних, вторинних і третинних амінів, заміщених амінів, в тому числі природних заміщених амінів, циклічних амінів і основних іонообмінних смол, таких як ізопропіламін, триметиламін, діетиламін, триетиламін, трипропіламін, етаноламін, 2-діетиламіноетанол, триметамін, дициклогексиламін, лізин, аргінін, гістидин, кофеїн, прокаїн, гідрабамін, холін, бетаїн, етилендіамін, глюкозамін, метилглюкамін, теобромін, пурини, піперазин, піперидин, N-етилпіперидин і поліамінні смоли.

"Сольват" відноситься до асоціації або комплексу однієї або більше молекул розчинника і сполуки за винаходом. Приклади розчинників, які утворюють сольвати, включають, але не обмежуються цим, воду, ізопропанол, етанол, метанол, ДМСО (диметилсульфоксид), етилацетат, оцтову кислоту і етаноламін.

Термін "EC₅₀" являє собою "напівмаксимальну ефективну концентрацію" і означає концентрацію конкретної сполуки в плазмі крові, необхідну для одержання конкретного ефекту *in vivo*, рівного 50 % від максимального.

Термін "K_i" відноситься до константи інгібування і означає абсолютну афінність зв'язування конкретного інгібітора з рецептором. Її вимірюють, використовуючи аналізи конкурентного зв'язування, і вона еквівалентна концентрації, при якій цей конкретний інгібітор буде займати 50 % рецепторів в разі відсутності будь-якого конкуруючого ліганду (наприклад, радіоактивного ліганду). Величини K_i можна перетворити логарифмічно в величини pK_i (-log K_i), при цьому більш високі значення вказують на експоненціально більш високу ефективність.

Термін "IC₅₀" відноситься до "концентрації, що викликає половину від максимального інгібування" і означає концентрацію конкретної сполуки, необхідну для одержання 50 % інгібування біологічного процесу *in vitro*. Величини IC₅₀ можна перетворювати логарифмічно в величини pIC₅₀ (-log IC₅₀), при цьому більш високі значення вказують на експоненціально більш високу ефективність. Величина IC₅₀ не є абсолютною величиною, а залежить від експериментальних умов, наприклад, від використовуваних концентрацій, і її можна перетворити в абсолютну константу інгібування (K_i), використовуючи рівняння Ченга-Прусссофа (Biochem. Pharmacol. (1973) 22: 3099). Можна розрахувати параметри для іншого відсотка інгібування, такі як IC₇₀, IC₉₀ і т. д.

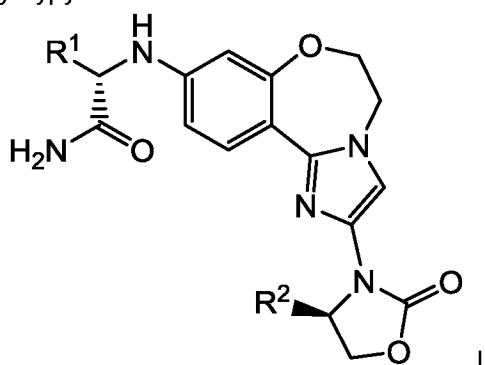
Терміни "сполука за даним винаходом", і "сполуки за даним винаходом", і "сполуки формули I" включають в себе сполуки формул I і стереоізомери, геометричні ізомери, таутомери, сольвати, метаболіти і фармацевтично прийнятні солі та їх проліки.

Мається на увазі, що будь-яка формула або структура, наведена в даному описі, включаючи сполуки формули I, також представляє гідрати, сольвати і поліморфи таких сполук та їх суміші.

Мається на увазі, що будь-яка формула або структура, наведена в даному описі, включаючи сполуки формули I, також представляє немічені форми, так само як і мічені ізотопом форми цих сполук. Мічені ізотопом сполуки мають структури, зображені формулами, наведеними в даному описі, але з урахуванням того, що один або більше ніж один атом замінений на атом, що має вибрану(е) атомну масу або масове число. Приклади ізотопів, які можуть бути інкорпоровані в сполуки за винаходом, включають ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню, фосфору, фтору і хлору, такі як, але не обмежуючись цим, ^2H (дейтерій, D), ^3H (третій), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl і ^{125}I . Включені різні мічені ізотопом сполуки за даним винаходом, наприклад, сполуки, в які інкорпоровані такі радіоактивні ізотопи, як ^3H , ^{13}C і ^{14}C . Такі мічені ізотопом сполуки можуть бути корисні в дослідженнях метаболізму, дослідженнях кінетики реакцій, методах детекції або візуалізації, таких як позитронно-емісійна томографія (PET) або однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (SPECT), в тому числі в аналізах розподілення лікарського засобу або субстрату в тканинах, або в лікуванні пацієнтів із застосуванням радіоактивних засобів. Мічені або заміщені дейтерієм терапевтичні сполуки за винаходом можуть мати поліпшені властивості з точки зору DMPK (метаболізму і фармакокінетики лікарських засобів), пов'язані з всмоктуванням, розподіленням, метаболізмом і екскрецією (ADME, англ. absorption, distribution, metabolism and excretion). Заміна на більш важкі ізотопи, такі як дейтерій, може давати деякі терапевтичні переваги, обумовлені більшою метаболічною стабільністю, наприклад, збільшений *in vivo* період напіввиведення або зниження дозування. Для досліджень з використанням PET або SPECT може бути корисна ^{18}F -мічена сполука. У загальному випадку, мічені ізотопом сполуки за даним винаходом та їх проліки можуть бути одержані шляхом здійснення методик, описаних на схемах або в розділах Приклади і Підготовчі приклади, викладених нижче, в результаті заміни не меченого ізотопом реагенту легко доступним міченим ізотопом реагентом. Крім того, заміна на більш важкі ізотопи, зокрема, дейтерій (тобто ^2H або D), може давати деякі терапевтичні переваги, обумовлені більшою метаболічною стабільністю, наприклад, збільшений *in vivo* період напіввиведення, або зниження дозування, або поліпшення терапевтичного індексу. Очевидно, що в цьому випадку дейтерій вважається замісником в сполуці формули (I). Концентрація такого більш важкого ізотопу, зокрема, дейтерію, може бути визначена за фактором ізотопного збагачення. Мається на увазі, що будь-який атом у сполуках за даним винаходом, спеціально не позначений як конкретний ізотоп, являє собою будь-який стабільний ізотоп цього атома. Якщо не вказано інше, то коли становище конкретно позначено як "H" або "атом водню", розуміють, що атом водню в даному положенні має свою природну ізотопну композицію. Відповідно мається на увазі, що будь-який атом у сполуках за даним винаходом, конкретно позначений як дейтерій (D), являє собою дейтерій.

Сполуки бензоксазепіноксазолідинонів

Згідно з даним винаходом запропоновані сполуки бензоксазепіноксазолідинонів формули I і фармацевтичні композиції на їх основі, які є потенційно корисними в лікуванні раку, мають структуру:



і стереоізомери, геометричні ізомери, таутомери та їх фармацевтично прийнятні солі, де:

R¹ вибраний з -CH₃, -CH₂CH₃, циклопропілу і циклобутилу;

R² вибраний з -CH₃, -CHF₂, -CH₂F і -CF₃.

Ілюстративні варіанти здійснення сполук формули I включають сполуки, де R¹ являє собою циклопропіл.

Ілюстративні варіанти здійснення сполук формули I включають сполуки, де R¹ являє собою CH₃ або циклопропіл.

Ілюстративні варіанти здійснення сполук формули I включають сполуки, де R¹ являє собою CH₃.

Ілюстративні варіанти здійснення сполук формули I включають сполуки, де R² являє собою -CHF₂.

Ілюстративні варіанти здійснення сполук формули I включають сполуки, де R² являє собою -CH₂F.

5 Ілюстративні варіанти здійснення сполуки формули I включають сполуку, де R¹ являє собою циклопропіл, а R² являє собою -CHF₂.

Ілюстративні варіанти здійснення сполуки формули I включають сполуку, де R¹ являє собою циклопропіл, а R² являє собою -CH₂F.

10 Ілюстративні варіанти здійснення сполуки формули I включають сполуку, де R¹ являє собою CH₃, а R² являє собою -CHF₂.

Ілюстративні варіанти здійснення сполук формули I включають сполуки з Таблиці 1.

15 Сполуки формули I за винаходом можуть містити асиметричні або хіральні центри і з огляду на це існувати в різних стереоізомерних формах. Мається на увазі, що всі стереоізомерні форми сполук за даним винаходом, включаючи, але не обмежуючись цим, діастереомери, енантіомери і атропоізомери, а також їх суміші, такі як рацемічні суміші, становлять частину винаходу. У деяких випадках стереохімічна конфігурація не була визначена або була присвоєна орієнтовно.

20 Крім цього, даний винахід охоплює всі діастереомери, включаючи цис/транс (геометричні) і конформаційні ізомери. Наприклад, якщо сполука формули I містить подвійний зв'язок або конденсоване кільце, то в об'єм винаходу включені цис- і транс-форми, а також їх суміші.

25 Якщо в структурах, наведених в даному описі, стереохімічна конфігурація якого-небудь конкретного хірального атома не конкретизована, то в якості сполук за винаходом охоплені і включені всі стереоізомери. Якщо стереохімічна конфігурація вказана суцільною клиноподібною або пунктирною лінією, що зображує конкретну конфігурацію, то зазначено і визначено саме цей стереоізомер.

Сполуки за даним винаходом можуть існувати в несольватованих, а також сольватованих формах з фармацевтично прийнятними розчинниками, такими як вода, етанол тощо, і мається на увазі, що даний винахід охоплює як сольватовані, так і несольватовані форми.

30 Сполуки за даним винаходом також можуть існувати в різних таутомерних формах, і всі такі форми включені в об'єм винаходу. Термін "таутомер" або "таутомерна форма" відноситься до структурних ізомерів, що володіють різною енергією, взаємоперетворення яких протікає через низький енергетичний бар'єр. Наприклад, протонні таутомери (також відомі як прототропні таутомери) характеризуються взаємоперетворенням в результаті міграції протона, як наприклад, при кето-енольній та імін-енамінній ізомерії. Валентні таутомери включають взаємоперетворення за допомогою реорганізації деяких з зв'язуючих електронів.

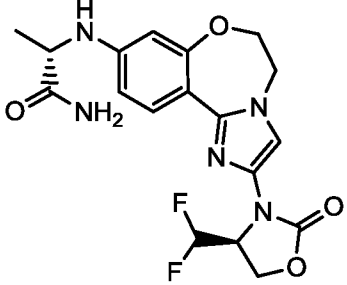
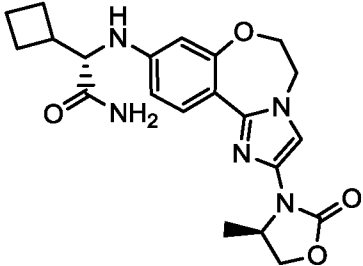
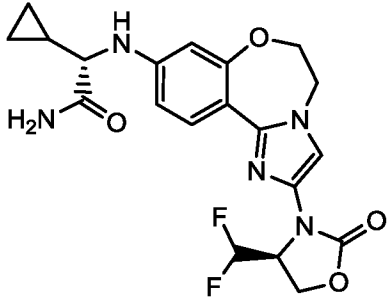
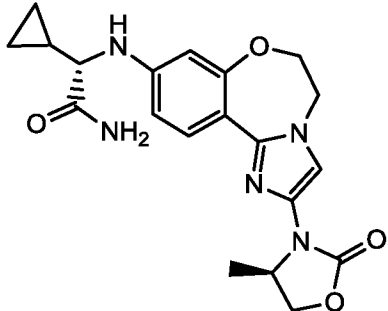
Біологічна оцінка

40 Величини відносної ефективності сполук формули I як інгібіторів ферментативної активності (або іншої біологічної активності) можна визначити, встановивши концентрацію, при якій кожна сполука інгібує активність до попередньо обумовленого ступеня і потім порівнявши результати. У типовому випадку, переважно визначають концентрацію, при якій активність в біохімічному аналізі інгібується на 50 %, тобто інгібуючу на 50 % концентрацію або "IC₅₀". Визначення величин IC₅₀ можна провести, використовуючи традиційні методи, відомі в даній області техніки. У загальному випадку IC₅₀ можна визначити за допомогою вимірювання активності заданого ферменту в присутності досліджуваного інгібітору, взятого в діапазоні концентрацій. Потім будують графік залежності експериментально одержаних значень ферментативної активності від використовуваних концентрацій інгібітору. Концентрацію інгібітора, при якій спостерігають 50 % ферментативної активності (в порівнянні з активністю за відсутності будь-якого інгібітору), приймають за величину IC₅₀. Аналогічно, концентрації, що викликають інший інгібуючий ефект, можна визначити за допомогою відповідних визначень активності. Наприклад, в деяких випадках постановки завдання може виявитися бажаним ввести концентрацію, що викликає пригнічення на 90 %, тобто IC₉₀, і т. д.

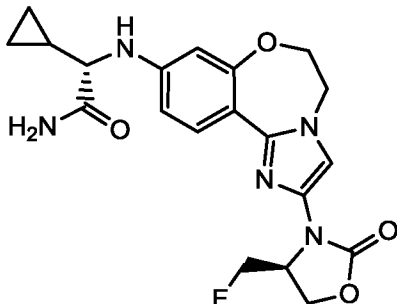
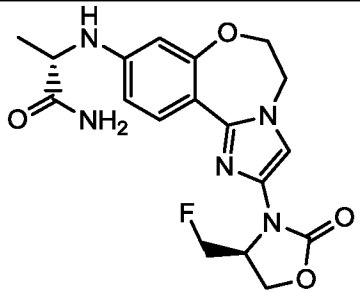
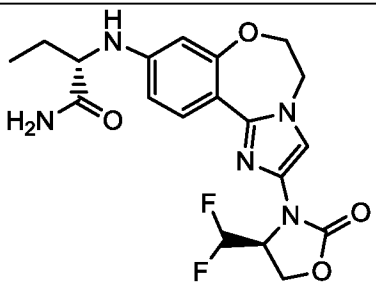
55 Одержували типові сполуки формули I, наведені в Таблиці 1, визначали їх характеристики і тестували на предмет зв'язування з різними ізоформами і мутантними формами PI3K відповідно до способів за даним винаходом, і вони мають наведені далі структури, відповідні назви (ChemBioDraw, версія 12.0.02, CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA) і біологічну активність. У тому випадку, коли сполука формули I або проміжна сполука співвідноситься більш ніж з однією назвою, така сполука буде визначатися за хімічною структурою.

Таблиця 1

Сполука формули I

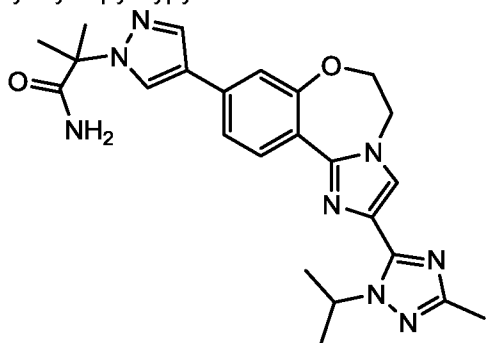
№	Структура	Назва
101		(S)-2-((2-((S)-4-(дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)пропанамід
102		(S)-2-циклобутил-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід
103		(S)-2-циклопропіл-2-((2-((S)-4-(дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід
104		(S)-2-циклопропіл-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід

Продовження таблці 1

105		(S)-2-((2-((S)-4-(фторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід
106		(S)-2-((2-((S)-4-(фторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)пропанамід
107		(S)-2-((2-((S)-4-(дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)бутанамід

Таселісіб

- 5 Сполука, відома як таселісіб, GDC-0032 і Roche RG7604 (реєстраційний № в CAS 1282512-48-4, Genentech Inc.), має назву за IUPAC: 2-(4-(2-(1-ізопропіл-3-метил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)-5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)-1H-піразол-1-іл)-2-метилпропанамід і наступну структуру:



таселісіб,

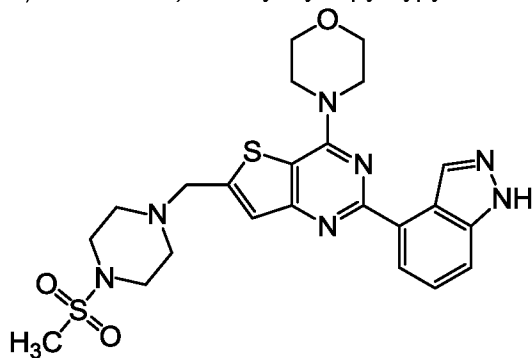
- 10 в тому числі стереоізомери, геометричні ізомери, таутомери та їх фармацевтично прийнятні солі.

Таселісіб може бути одержаний і охарактеризований так, як описано в WO 2011/036280, US 8242104 і US 8343955.

Піктилісіб

- 15 Сполука, відома як піктилісіб (pictilisib) GDC-0941, Roche, RG-7321, і піктрелісіб (pictrelisib) (CAS Реєстр. № 957054-30-7, Genentech Inc.), являє собою сильнодіючий націлений на багато мішеней інгібітор ізоформ PI3K пан-класу I (class I (pan)). В даний час GDC-0941 проходить фазу II клінічних випробувань на предмет лікування поширених форм солідних пухлин. GDC-0941 має назву 4-(2-(1H-індазол-4-іл)-6-((4-(метилсульфоніл)піперазин-1-іл)метил)тіено[3,2-d]піримідин-4-іл)морфолін (US 7781433; US 7750002; Folkes et al. (2008) Jour. of Med. Chem.,

51(18): 5522-5532) і наступну структуру:

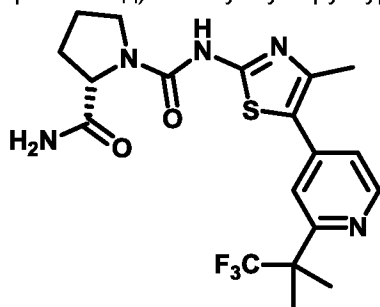


пiкiлiсib,

в тому числі стереоізомери, геометричні ізомери, таутомери та їх фармацевтично прийнятні солі.

5 Алпелісib

Сполука, відома як алпелісib (BYL719, Novartis, № в CAS: 1217486-61-7), являє собою пероральний селективний інгібітор ізоформи PI3K-альфа і проходить клінічні випробування, що стосуються можливості лікування різного типу пухлин, включаючи фазу III випробування, в комбінації з фулвестрантом в якості терапії другої лінії в разі позитивного до рецепторів гормонів, HER2- поширеного метастатичного раку молочної залози (Furet P. et al. (2013) Bioorg. Med. Chem. Lett., 23: 3741-3748; US 8227462; US 8476268; US 8710085). Алпелісib має назву (S)-N1-(4-метил-5-(2-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-іл)піридин-4-іл)тіазол-2-іл)піролідин-1,2-дикарбоксамід) і наступну структуру:



алпелісib.

Біохімічні дані, що характеризують інгібування ізоформ pi3k

Здатність сполуки за винаходом діяти як інгібітор PI3Kα з селективністю, що перевищує таку відносно PI3Kβ, PI3Kδ і PI3Kγ, визначали, використовуючи методи з прикладу 901. Значення K_i, показані в Таблицях 2A і 2B, являють собою середнє геометричне значення як мінімум з трьох незалежних експериментів, якщо не вказано інше.

У Таблиці 2A показані біохімічні дані, що характеризують інгібування чотирьох ізоформ PI3K сполуками формули I з Таблиці 1. Крім цього, в якості сполук порівняння включені дві клінічно протестовані відносно PI3K сполуки, таселісib і пікiлiсib. Репрезентативні сполуки за винаходом демонструють сильну PI3Kα-інгібуючу активність і, в порівнянні з таселісibом (GDC-0032) і пікiлiсibом (GDC-0941), демонструють істотно вищу селективність відносно інших ізоформ PI3Kβ, PI3Kδ і PI3Kγ. Зокрема, показники селективності, наведені в другому справа стовпці Таблиці 2A, демонструють, що кожна із сполук 101-107 формули I має показник селективності відносно PI3K, від альфа до дельта, набагато вищий, ніж таселісib або пікiлiсib. Фактично, і таселісib, і пікiлiсib виявляють більш високу PI3K-дельта-інгібуючу активність, ніж по відношенню до PI3K-альфа, тобто їх показники селективності для них менше 1. Показники селективності сполук 101-107 формули I знаходяться в діапазоні від 301 до 634.

У Таблиці 2B показані біохімічні дані, що характеризують інгібування двох ізоформ PI3K, альфа і дельта, і показники селективності відносно PI3K, від альфа до дельта, в порівнянні з деякими сполуками порівняння з US 8242104 і сполукою, що несе групу диметилпиперидин-2-ону, з US 8263633 (сполука 356, колонка 149). Ці сполуки порівняння, наведені в даному описі в Таблиці 2B, являють собою приклади численних класів сполук, описаних в кожному з US 8242104 і US 8263633. Ні в US 8242104, ні в US 8263633 не описано сполуку, що входить в об'єм сполук формули I за винаходом. Хоча репрезентативні приклади сполук порівняння з US 8242104, які описані в Таблиці 2B, демонструють показники селективності відносно PI3Kα (альфа) відносно PI3Kδ (дельта), що перевищують 1, максимальний спостережуваний показник селективності становить 46,9. Таким чином, при застосуванні сполук 101-107 формули I

досягають значно вищих показників селективності, ніж в разі сполук із прикладів в US 8242104. Ні в US 8242104, ні в US 8263633 немає ніяких вказівок на те, як здійснити вибір структурних елементів сполук формули I для придбання властивості високої селективності по відношенню до PI3K-альфа у порівнянні з PI3K-дельта. Це несподіване властивість, що полягає в придбанні в більше ніж в 300 разів вищої селективності відносно PI3K-альфа, зберігається для всього спектру сполук, наведених як приклад в Таблиці 1.

Інгібітори PI3K, що проходять в даний час клінічні випробування, такі як таселісіб (WO 2011/036280; US 8242104; US 8343955), та інші репрезентативні сполуки з прикладів в US 8242104 демонструють значну активність проти ізоформи PI3K δ (дельта). При цьому, відсутність селективності відносно PI3K δ (дельта) узгоджується з ШК токсичним ефектом таселісибу, що спостерігається в клінічних випробуваннях. Існує потреба в інгібіторах PI3K α (альфа), що володіють сприятливими характеристиками, властивими сполукам із прикладів в US 8242104, у яких одночасно з цим відсутня активність проти PI3K δ (дельта). Відповідно до даного винаходу запропоновані сполуки, які відповідають такій активності і такому профілю селективності.

Ця несподівана властивість селективності відносно PI3K-альфа є сприятливою в плані усунення шлунково-кишкового токсичного ефекту, що спостерігається в клінічних випробуваннях кандидатів в інгібітори PI3K. Завдяки нещодавно одержаним клінічним даним для інгібіторів PI3K відзначено участь активності PI3K-дельта в якості джерела шлунково-кишкових токсичних ефектів (Akinleye et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics", Journal of Hematology & Oncology, 2013, 6 : 88-104). Див. Таблицю 2 з даними клінічних випробувань інгібіторів PI3K - таселісибу і піктилісибу.

Таким чином, з огляду на значно більш високу селективність інгібування PI3K α (альфа) в порівнянні з інгібуванням PI3K δ (дельта) можна очікувати, що сполуки 101-107 формули I матимуть більший інтервал між клінічною активністю, спричиненою інгібуванням PI3K α (альфа), і токсичними ефектами, що викликаються інгібуванням PI3K δ (дельта), в порівнянні з такими, що проходять клінічні випробування таселісібом і піктилісібом або будь-якою із сполук прикладів з US 8242104 або US 8263633. Відповідно, сполуки формули I винаходу можуть бути корисні як терапевтичні агенти зі зниженим профілем токсичності в порівнянні з агентами, які демонструють більш сильне інгібування нормального функціонування PI3K β , PI3K δ або PI3K γ .

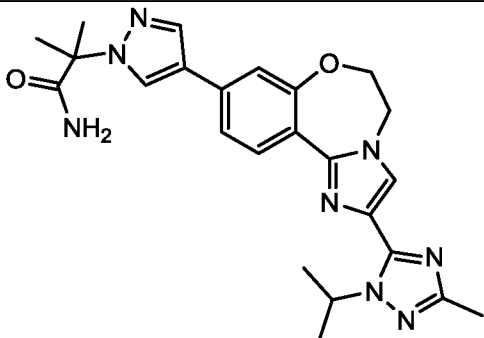
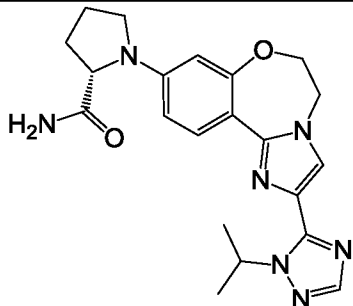
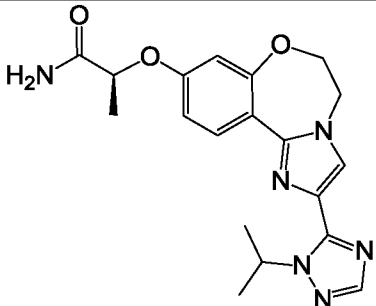
Таблиця 2A

Біохімічні дані, що характеризують інгібування ізоформ PI3K сполуками формули I і сполуками порівняння таселісібом і піктилісібом

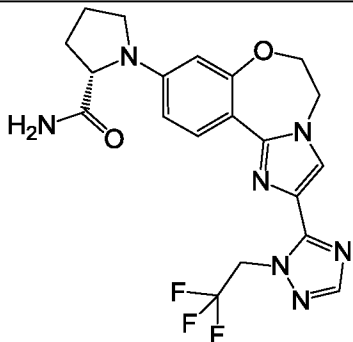
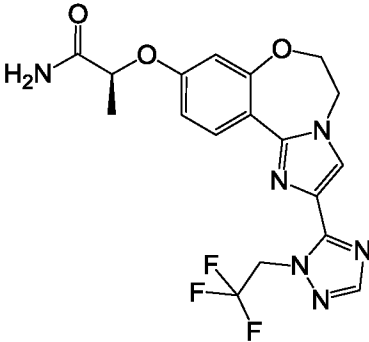
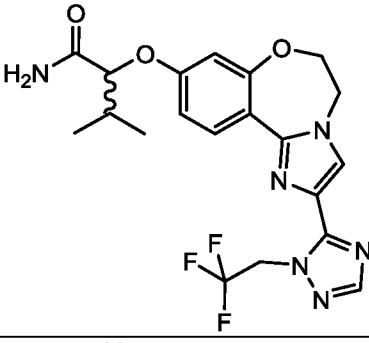
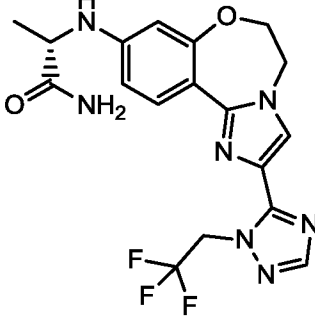
№ сполуки	PI3K α , Ki (нМ)	PI3K β , Ki (нМ)	PI3K δ , Ki (нМ)	PI3K γ , Ki (нМ)	Селектив- ність до PI3K α відн. PI3K- β	Селективність до PI3K α відн. PI3K- δ	Селектив- ність до PI3K α відн. PI3K- γ
таселісіб GDC-0032	0,090	53,0	0,079	1,43	591	0,9	16,0
піктилісіб GDC-0941	2,56	70,2	1,54	41,8	27,4	0,6	16,3
101	0,034	99,7	12,2	18,2	2944	361	537
102	0,949	>1000	286	708	>1054	301	746
103	0,060	335	37,7	49,0	5640	634	824
104	0,464	813	197	289	1750	425	622
105	0,051	341	30,3	36,4	6718	598	717
106	0,040	122	16,7	17,8	3050	416	444
107	0,048	132	17,5	23,7	2782	368	499

Таблиця 2В

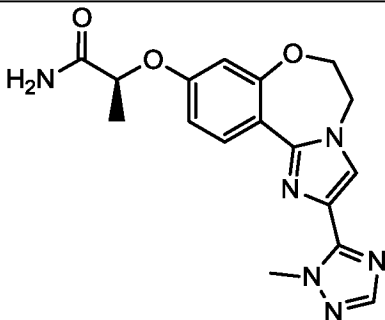
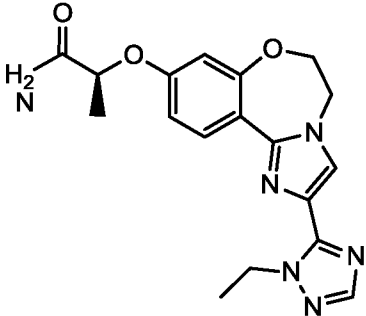
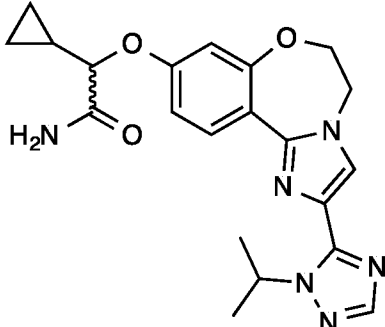
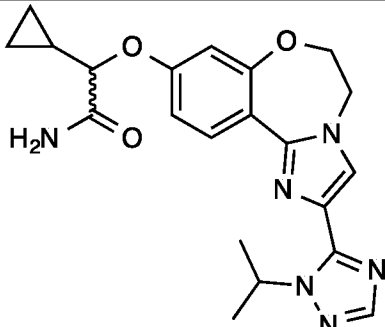
Біохімічні дані, що характеризують інгібування ізоформ PI3K сполуками порівняння

№ (US 8242104)	Структура	PI3K α , Ki (нМ)	PI3K δ , Ki (нМ)	Селектив- ність до PI3K α відн. PI3K- β
196 таселісіб GDC-0032		0,090	0,079	0,88
375		0,016	0,417	21,7
436		0,35	6,94	22,3

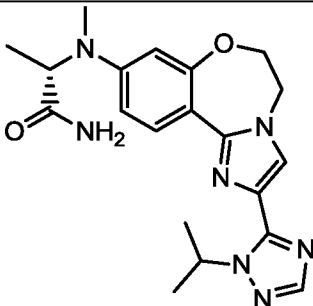
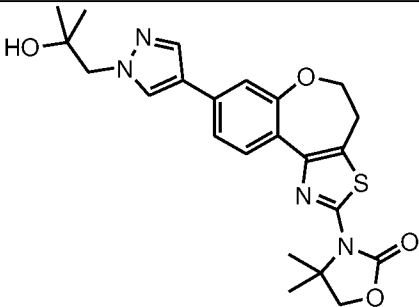
Продовження таблиці 2В

469		<0,02*	0,39*	19,3
486		0,186**	2,5**	13,4
501		3,56**	21,8**	6,1
529		0,023	1,05	46,9

Продовження таблиці 2В

540		2,72**	24,1**	8,8
544		0,437**	11,3**	25,8
549 (виділений стерео-ізомер 1)		0,56**	9,41**	17,0
549 (виділений стерео-ізомер 2)		5,66**	1,70**	0,30

Продовження таблиці 2В

550		0,107	1,96	19,4
356 (US 8263633)		0,967**	0,92**	0,95

* Значення Кі являє собою середнє по двом експериментам, ** значення Кі являє собою результат одного експерименту.

5

Взаємодія сполук з ріЗк

Рациональна основа селективності сполук формули I відносно РІЗКа може полягати в визначених обумовлюючих зв'язування взаємодіях.

Здатність сполуки за винаходом специфічно взаємодіяти з РІЗКа оцінювали за допомогою дозволу одержаної з використанням рентгенівського випромінювання спільної кристалічної структури репрезентативних сполук разом з РІЗКа (альфа), застосовуючи методи з прикладу 908. Оптимізований структурний дизайн інгібіторів РІЗК з селективністю відносно ізоформи РІЗКа, що перевищує селективність відносно інших ізоформ, може включати точну орієнтацію і точне розташування атомів і функціональних груп, необхідні для взаємодії зі специфічними для даної ізоформи залишками в сайті зв'язування. Зокрема, виявлено, що заміщення в положенні 9 і в положенні 2 5,6-дигідробензо[ф]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепінової кільцевої системи виявляє істотно важливий вплив на специфічну активність сполук проти РІЗКа.

На Фіг. 1А-Д показані одержані з використанням рентгенівського випромінювання спільні кристалічні структури таселісибу (GDC-0032), сполуки порівняння 529 (US 8242104) і двох репрезентативних сполук за винаходом з РІЗКа. Як показано на Фіг. 1А, таселісиб (GDC-0032) містить функціональну групу первинного аміду, яка знаходиться в тісному контакті як з Gln859, так і з Ser854, і мабуть дає можливість взаємодій за допомогою утворення водневих зв'язків. Залишок Gln859 специфічний для ізоформи РІЗКа, при цьому в інших ізоформах це положення займає інший залишок (в РІЗКβ це Asp, в РІЗКδ це Asn, в РІЗКγ це Lys). Однак, незважаючи на такий тісний контакт з РІЗКа-специфічним залишком, GDC-0032 за результатами вимірювань в біохімічному аналізі має однакову активність проти обох ізоформ РІЗКа і РІЗКδ і лише злегка знижену активність проти ізоформи РІЗКγ (див. Таблицю 2А).

Як показано на Фіг. 1В, сполука порівняння 529 (US 8242104) містить функціональну групу первинного аміду в тому ж положенні, що і таселісиб. Ця функціональна група знаходиться на відповідній відстані як від Ser854, так і від Gln859, і характеризується відповідною геометрією розташування відносно них обох, щоб здійснити взаємодії за допомогою утворення водневих зв'язків. У 46,9 разів вищий показник селективності відносно РІЗКа в порівнянні з РІЗКδ (див. Таблицю 2В) може бути логічно пояснено з урахуванням цих взаємодій і того знання, що РІЗКδ не містить залишку Gln в положенні 859, і тому ці взаємодії повинні бути специфічними для РІЗКа.

На Фіг. 1С і 1Д показано, що кожний первинний амід (S)-2-амінопропанамідної групи сполуки 101 і (S)-2-аміно-2-циклопропілацетамідної групи сполуки 103 займає дуже схоже в порівнянні з первинними амідами GDC-0032 і сполуки порівняння 529 (US 8242104) становище в сайті зв'язування. Ця функціональна група первинного аміду в кожній репрезентативній сполуці за

винаходом знаходиться на відповідній відстані як від Ser854, так і від Gln859, і характеризується відповідною геометрією розташування відносно них обох, щоб здійснити взаємодії за допомогою утворення ідеальних водневих зв'язків. Незважаючи на явну схожість в розміщенні і орієнтації функціональних груп, репрезентативні сполуки з прикладів, показані на Фіг. 1C і 1D, а також інші сполуки за даним винаходом зі схожими замісиками та функціональними групами демонструють покращену взаємодію первинного аміду в порівнянні як з таселісибом, так і з сполукою порівняння 529 (US 8242104), в результаті чого сполуки за даним винаходом, як встановлено, мають істотно більш високу селективність до PI3K α в порівнянні з PI3K δ , за результатами вимірювань в біохімічному аналізі. Сполука 101 виявляється в 361 разів більше селективною, а сполука 103 виявляється в 634 рази більше селективною, що є істотним збільшенням в порівнянні з сполукою порівняння 529 (US 8242104), яка виявляється лише в 46,9 рази більше селективною. З урахуванням подібності в орієнтації функціональної групи первинного аміду при порівнянні з таселісибом та іншими сполуками з US 8242104 (прикладом яких є сполука порівняння 529) підвищена селективність до PI3K α в порівнянні з PI3K δ , демонстрована сполуками за даним винаходом, є несподіваною властивістю. В US 8242104 немає ніяких посилань на те, як здійснити вибір структурних елементів сполук формули I для придбання властивості високої (більше ніж в 300 разів вищої) селективності відносно PI3K-альфа. Сполуки формули I за винаходом демонструють покращену взаємодію первинного аміду в порівнянні з GDC-0032, в результаті чого сполуки за даним винаходом, як встановлено, мають істотно більш високу селективність до PI3K α в порівнянні з PI3K δ , за результатами вимірювань в біохімічному аналізі, відносно сполук порівняння (див. Таблиці 2A і 2B).

На Фіг. 2A показана одержана з використанням рентгенівського випромінювання структура таселісибу, пов'язаного в активному центрі PI3K α (альфа). Атом N2 триазольного кільця не може взаємодіяти безпосередньо з бічним ланцюгом Tyr836 (відстань 4,04 Å) або Ser774 (відстань 2,74 і 2,82 Å, відсутність будь-якої взаємодоповнюючої полярності між лігандом і залишком). На Фіг. 2B показана одержана з використанням рентгенівського випромінювання структура сполуки 101, пов'язаної в активному центрі PI3K-альфа, і показано, що оксазолідинонове кільце здатне здійснювати численні поліпшені взаємодії з білком в порівнянні з триазольним кільцем. Карбонільна функціональна група розташовується близько до бічного ланцюга Tyr836 (2,67 Å) і здатна приймати участь в сприятливій дипольній взаємодії. Атом фтору замісника на оксазолідиноновому кільці знаходиться в тісному контакті (2,21 Å) з гідроксильною групою Ser774, що узгоджується з можливістю дипольної взаємодії або утворення неklasичного водневого зв'язку, сприятливої взаємодії, що забезпечується за рахунок поляризації зв'язку вуглець-фтор (Böhm et al., *Fluorine in Medicinal Chemistry*, (2004) *ChemBioChem*, 5: 637-643; Zhou et al., "Fluorine Bonding - How Does it Work In Protein-Ligand Interactions", (2009) *J. Chem. Inf. Model.*, 49: 2344-2355).

Всі сполуки за винаходом містять оксазолідинонове кільце і здатні брати участь в покращеній взаємодії з Tyr836 в PI3K α (альфа). Деякі сполуки з прикладів даного винаходу також містять фторований замісник на оксазолідиноновому кільці і здатні брати участь в покращеній взаємодії з Ser774 в PI3K α . Обидва ці обумовлюючі зв'язування взаємодії можуть вносити вклад в підвищену селективність до PI3K α , що спостерігається у сполук з прикладів даного винаходу в порівнянні з сполуками з прикладів в US 8242104. Як показано в Таблицях 2A і 2B, сполуки, які містять оксазолідинонове кільце, мають більш високу селективність відносно ізоформ, ніж сполуки порівняння, які містять триазольне кільце. Залишки Ser774 і Tyr836 не є чимось унікальним для ізоформи PI3K α ; PI3K δ містить ці ж залишки в тих же самих положеннях, і підвищену селективність для інгібіторів з оксазолідиноновим кільцем відносно ізоформ не можна передбачити, виходячи з цих кристалічних структур. Тонкі відмінності між різними ізоформами в розташуванні і орієнтації одних і тих же залишків можуть витікати з тонких змін у вторинній та третинній структурі білка. Ці відмінності важко передбачити і інтерпретувати навіть з урахуванням знання кристалічних структур, одержаних з використанням рентгенівського випромінювання, для обох ізоформ білка. Ці дивовижні і несподівані властивості інгібіторів, що містять оксазолідинонове кільце, можуть брати участь в поліпшених молекулярних взаємодіях і проявляти підвищену селективність відносно ізоформ зберігаються для всього спектру сполук, наведених як приклад в Таблиці 1.

Оксазолідинон структурно відрізняється від триазолу тим, що оксазолідинон має карбонільну групу, є більш полярним і не володіє ароматичними властивостями. Триазол не має карбонільної групи, є менш полярним і володіє ароматичними властивостями.

Оксазолідинонове кільце забезпечує додаткову перевагу в порівнянні з триазольним кільцем з точки зору посилення характеру гібридизації в бік утворення sp³-орбіталей і меншого числа ароматичних кілець. Згідно з літературними даними прийнято вважати, що більш високе

число ароматичних кілець корелює з підвищеним ризиком випадкового зв'язування. Навпаки, збільшення частки атомів вуглецю в sp^3 -гібридації (число атомів вуглецю в sp^3 -гібридації/загальне число атомів вуглецю) корелює з поліпшеними фізико-хімічними властивостями і більш низькою ймовірністю випадкового зв'язування, зниженням ризику побічної токсикологічної дії. Ці відомості наведені в посиланнях Lovering et al., "Escape From Flatland", (2009) J. Med. Chem., 52: 6752-6756 і Ritchie and Macdonald, "Physicochemical Descriptors of Aromatic Character and Their Use in Drug Discovery", (2014) J. Med. Chem., 57: 7206-7215. Заміна триазольного ароматичного кільця, прикладами якого є репрезентативні сполуки з US 8242104, на насичене гетероциклічне кільце, тобто оксазолідинонове кільце, що міститься в кожній сполуці з прикладів даного винаходу, являє собою сприятливе зниження ризику побічної токсикологічної дії. Сукупність сполук, наведених як приклади в US 8242104, в переважній більшості випадків представлена сполуками з ароматичними кільцями в цьому положенні, 4-ма прикладами карбоксамідної функціональної групи, що заміщує ароматичне кільце, і при цьому немає жодного прикладу насичених циклічних або гетероциклічних систем. Внаслідок значно різняться обумовлюючи зв'язування взаємодій і стеричних вимог в разі ароматичних і насичених гетероциклів, зазвичай вони не є взаємозамінними. У зв'язку з відсутністю будь-яких прикладів насичених гетероциклічних систем в положенні 2 5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепінового кільця, в US 8242104 не наводиться жодних вказівок щодо способу заміни ароматичного кільця насиченим гетероциклом з одночасним збереженням активності проти PI3K α .

Відповідно, сполуки за винаходом містять оптимізовані замісники і функціональні групи як в положенні 9, так і в положенні 2 5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепіну. Ці оптимізовані сполуки забезпечують значну і до теперішнього моменту невідому перевагу, що стосується поліпшених молекулярних взаємодій і підвищеної виборчої активності проти PI3K α , зі зниженою активністю проти PI3K β . Сполуки за винаходом можуть бути корисні як терапевтичні агенти з поліпшеним терапевтичним вікном в порівнянні зі схожими агентами, такими як таселісіб (GDC-0032).

Селективне інгібування мутантної форми рi3K α (альфа)

Здатність сполуки за винаходом діяти переважно на клітини, що містять мутантну форму PI3K α , визначали за допомогою вимірювання інгібування PI3K-шляху в ізогенних клітинних лініях SW48, що містять: PI3K α дикого типу (вихідну форму), з мутацією E545K в спіральному домені і з мутацією H1047R в кіназному домені, як описано в методах з прикладу 902.

Статистичний аналіз: значення EC₅₀ являють собою середнє геометричне значення як мінімум з 4-х незалежних експериментів, якщо не вказано інше. Всі статистичні викладки виконували з використанням програмного забезпечення KaleidaGraph (версія 4.1.3). t-критерій Стюдента для порівняння активності відносно клітин з мутаціями і клітин дикого типу визначали з використанням непарних даних з рівними дисперсіями. Значення P менше 0,05 вважається статистично значимим.

У Таблиці 3A показано інгібування фосфорильованого збагаченого залишками проліну субстрату Akt з MM 40 кДа (p-PRAS40 - Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa) в ізогенних клітинах SW48 сполуками формули I з Таблиці 1. Всі ці сполуки виявляють підвищену активність проти клітин з мутантною формою PI3K α в порівнянні з клітинами з PI3K α дикого типу. Сполуки за винаходом демонструють активність аналогічно таселісіб у клітинах SW48 з мутантною формою PI3K α , з селективністю таселісіб, що дорівнює або перевищує, в порівнянні з активністю в клітинах з PI3K α дикого типу (див. Таблицю 3B).

У Таблиці 3B показано інгібування утворення p-PRAS40 в ізогенних клітинах SW48 деякими сполуками порівняння з US 8242104, сполукам, що несе групу диметилноксазолідин-2-ону, з US 8263633 (сполукою 356, колонка 149) і піктилісібом. Сполуки порівняння, наведені в даному описі в Таблиці 3B, являють собою приклади численних класів сполук, описаних в кожному з US 8242104 і US 8263633. Ні в US 8242104, ні в US 8263633 не описано сполуку, що входить в об'єм сполук формули I за даним винаходом. Сполуки порівняння включають сполуки з прикладів, які не володіють значно підвищеною активністю відносно клітин з мутантною формою PI3K α в порівнянні з клітинами з PI3K α дикого типу (див. сполуки порівняння 436 і 549; р більше 0,05). Ці сполуки структурно дуже схожі на сполуки порівняння, які демонструють значно більш високу активність у відношенні клітин з мутантною формою PI3K α в порівнянні з клітинами з PI3K α дикого типу (див. сполуку порівняння 529). У даних сполук порівняння немає ніякого загального структурного елементу, який би давав вказівки відносно селективного інгібування клітин з мутантною формою PI3K α (альфа). У більш широкому сенсі, ні в US 8242104, ні в US 8263633 немає ніяких вказівок на те, як здійснити вибір структурних елементів сполук формули I для придбання підвищеної або еквівалентної активності проти клітин з мутантною формою PI3K α .

в порівнянні з клітинами з PI3Kα дикого типу. Ця неочікувана властивість зберігається для всього спектру сполук, наведених як приклад в Таблиці 1.

Таблиця 3А

Інгібування P-PRAS40 в ізогенних клітинах SW48 сполуками формули I

№	P-PRAS40-що містять SW48 (E545K), EC ₅₀ (мкМ)	P-PRAS40-що містять SW48 (H1047R), EC ₅₀ (мкМ)	P-PRAS40-що містять SW48 (вихідні), EC ₅₀ (мкМ)	Кратність селективності для SW48(E545K) відн. SW48 (вихідні)	Кратність селективності для SW48(H1047R) відн. SW48 (вихідні)
101	0,0027	0,0030	0,0063	2,4 (p < 0,001)	2,1 (p = 0,002)
102	0,0335	0,0358	0,0849	2,5 (p = 0,002)	2,4 (p = 0,001)
103	0,0041	0,0038	0,0101	2,5 (p < 0,001)	2,6 (p < 0,001)
104	0,0200	0,0228	0,0618	3,1 (p = 0,007)	2,7 (p = 0,009)
105	0,0042	0,0048	0,0125	3,0 (p = 0,007)	2,6 (p = 0,007)
106	0,0045	0,0044	0,0115	2,5 (p = 0,003)	2,6 (p = 0,001)
107	0,0053	0,0052	0,0108	2,0 (p = 0,003)	2,1 (p = 0,003)

5

Таблиця 3В

Інгібування P-PRAS40 в ізогенних клітинах SW48 сполуками порівняння

Сполука або № (US 8242104)	P-PRAS40-що міст. SW48 (E545K), EC ₅₀ (мкМ)	P-PRAS40-що міст. SW48 (H1047R), EC ₅₀ (мкМ)	P-PRAS40-що міст. SW48 (вихідні), EC ₅₀ (мкМ)	Кратність селективності для SW48(E545K) відн. SW48 (вихідні)	Кратність селективності для SW48(H1047R) відн. SW48 (вихідні)
196 таселісіб GDC-0032	0,0034	0,0040	0,0079	2,3 (p<0,001)	2,0 (p<0,001)
піктилісіб GDC-0941	0,0284	0,0321	0,0315	1,1 (p=0,7)	1,0 (p=0,9)
436 GDC-0326	0,0095	0,0092	0,0128	1,3 (p=0,26)	1,4 (p=0,22)
529	0,0008	0,0009	0,0016	2,2 (p<0,001)	2,0 (p=0,002)
549 (виділений стереоізомер 1)	0,0105*	0,0147*	0,0119*	1,1	0,8

*EC₅₀ являє собою результат одного експерименту.

Антипроліферативна активність в пухлинних клітинах з мутантною формою p13k

- 10 Здатність сполуки з винаходом діяти на пухлинні клітини, що містять мутантну форму PI3K, визначали за допомогою вимірювання EC₅₀ за життєздатністю клітин на клітинах HCC1954 (PI3Kα з мутацією H1047R) і клітинах MCF7 (PI3Kα з мутацією E545K), використовуючи методи з прикладу 903. В Таблиці 4 показано, що репрезентативні сполуки формули I, 101 і 103 за даним винаходом, здатні інгібувати PI3K-шлях та інгібувати проліферацію клітин HCC1954 і клітин
- 15 MCF7 з однаковим рівнем ефективності, що і сполуки порівняння, таселісіб (сполука 196, US 8242104), піктилісіб і сполука 436 (US 8242104).

Таблиця 4

Антипроліферативна активність PI3K-інгібуючих сполук в пухлинних клітинах з мутантною формою PI3K-альфа

Сполука або №	Антипроліферативна дія відносно HCC1954, EC ₅₀ (мкМ)	Антипроліферативна дія відносно MCF7, EC ₅₀ (мкМ)
Таселісіб 196 (US 8242104) GDC-0032	0,04	0,02
пiктилісiб GDC-0941	0,75	0,12
436 (US 8242104)	0,35	0,09
101	0,06	0,03
103	0,07	0,03

Ефективність in vivo

В Таблицях 5-8 показані дані досліджень інгібування росту пухлин (TGI) in vivo PI3K-інгібуючими сполуками. Зміна об'єму пухлин вимірювали протягом 20 діб або більше в групах мишей з ослабленим імунітетом, які несуть ксенотрансплантати раку молочної залози, яким один раз на добу перорально (п/о) вводили розчинник і PI3K-інгібуючі сполуки (приклад 904).

В Таблиці 5 показано, що в максимальних дозах (MTD), що переносяться, кожна із сполук, GDC-0032 (таселісіб), сполука 103 і сполука 101, виявляється більш ефективною, ніж алпелісіб (BYL-719) в моделі пухлини з мутантною формою PI3K.

В Таблиці 6 показано, що в дозах нижче максимальної переносимої дози (тобто 25 мг/кг) сполука 101 виявляється більш ефективною, ніж GDC-0032 в моделі пухлини з мутантною формою PI3K. Існує потенційна можливість для досягнення більш високого терапевтичного індексу (TI) при використанні сполуки 101, оскільки максимальна ефективна доза досягається раніше максимальної переносимої дози.

В Таблиці 7 показано, що в максимальних дозах, що переносяться, більш високі відповіді (PR (Partial Response - часткова відповідь) і CR (Complete Response - повна відповідь)) спостерігаються при використанні сполуки 101 у порівнянні з GDC-0032 в моделі пухлини з мутантною формою PI3K. Крім того, в максимальних які дозах GDC-0032 і BYL-719 опиняються однаково ефективними.

В Таблиці 8 показано, що в максимальних дозах, що переносяться, GDC-0032 і сполука 101 виявляються ефективнішими, ніж BYL-719, і сполука 101 приблизно настільки ж ефективна, як і GDC-0032, в моделі пухлини з мутантною формою PI3K.

Таблиця 5

Порівняння максимальних доз (MTD), що переносяться, PI3K-інгібуючих сполук в (ER-, PI3K^{H1047R})-ксенотрансплантатній моделі раку молочної залози HCC-1954x1

PI3K-інгібуюча сполука	%TGI	PR	CR
BYL-719, 40 мг/кг, 1х/доба (один раз на добу), п/о	80	1	1
GDC-0032, 15 мг/кг, 1х/доба, п/о	118	4	0
Сполука 103, 100 мг/кг, 1х/доба, п/о	120	4	3
Сполука 101, 50 мг/кг, 1х/доба, п/о	129	10	0

Таблиця 6

Дослідження з метою визначення оптимальної дози сполуки 101 в (ER-, PI3K^{H1047R})-ксенотрансплантатній моделі раку молочної залози HCC-1954x1

PI3K-інгібуюча сполука	%TGI	PR	CR
Сполука 101, 0,5 мг/кг, п/о, 1х/доба	19	0	0
Сполука 101, 1 мг/кг, п/о, 1х/доба	60	2	0
Сполука 101, 2,5 мг/кг, п/о, 1х/доба	68	1	0
Сполука 101, 5 мг/кг, п/о, 1х/доба	84	0	0
Сполука 101, 25 мг/кг, п/о, 1х/доба	140	7	0
Сполука 101, 50 мг/кг, п/о, 1х/доба	149	6	0
GDC-0032, 15 мг/кг, п/о, 1х/доба	111	2	0

Таблиця 7

Дослідження з метою визначення оптимальної дози сполуки 101 в (ER-, PI3K^{H1047R})-ксенотрансплантатній моделі раку молочної залози KPL-4

PI3K-інгібуюча сполука	%TGI	PR	CR
Сполука 101, 1 мг/кг, п/о, 1х/доба	28	0	0
Сполука 101, 2,5 мг/кг, п/о, 1х/доба	86	1	0
Сполука 101, 5 мг/кг, п/о, 1х/доба	93	1	0
Сполука 101, 15 мг/кг, п/о, 1х/доба	125	5	0
Сполука 101, 25 мг/кг, п/о, 1х/доба	135	9	0
Сполука 101, 50 мг/кг, п/о, 1х/доба	153	9	1
GDC-0032, 15 мг/кг, п/о, 1х/доба	113	3	0

Таблиця 8

Порівняння GDC-0032, сполуки 101 і BYL-719 в (ER+, PI3K^{H1047R})-ксенотрансплантатній моделі на основі виділених з пацієнтів (PDX, відт. англ. patient-derived xenograft) ракових пухлин молочної залози HCI-003

PI3K-інгібуюча сполука	%TGI	PR	CR
BYL-719, 40 мг/кг, п/о, 1х/доба	114	2	0
GDC-0032, 15 мг/кг, п/о, 1х/доба	162	6	1
Сполука 101, 50 мг/кг, п/о, 1х/доба	175	5	2

Інгібування шляху в виділених В-клітинах

- Здатність сполуки за винаходом інгібувати PI3K-шлях в В-клітинах оцінювали за впливом сполук на рівні CD69 після агоністичної обробки α -IgM, використовуючи методи з прикладу 906. Вважається, що експресія CD69 в В-клітинах, що є результатом обробки α -IgM, керується за допомогою передачі сигналу через PI3K δ (дельта). В Таблиці 9 показано, що репрезентативні сполуки формули I є більш селективними інгібіторами шляху передачі сигналу в лінії з мутантною формою PI3K (SW48 (H1047R)) відносно В-клітин (колонка 3) в порівнянні з таселісібом, піктилісібом, алпелісібом, сполукою 436 (US US8242104) та іделалісібом.

Таблиця 9

Інгібування експресії CD69 в В-клітинах окремими сполуками

№	IC ₅₀ (мкМ) в разі експресії CD69 в оброблених α -IgM В клітинах, скоригована з урахуванням зв'язування білками плазми крові*	[IC ₅₀ в разі експресії CD69 в оброблених α -IgM В-клітинах, скоригована з урахуванням зв'язування білками плазми крові*] / [EC ₅₀ в разі p-PRAS40 в SW48(H1047R)]
101	0,047	16
103	0,076	20
Таселісіб	0,00031	0,077
Піктилісіб	0,006	0,19
Алпелісіб	0,048	0,79
Сполука 436 (US8242104)	0,020	2,2
Іделалісіб	0,048	< 0,048

- * IC₅₀ в разі експресії CD69, виміряна в цільній крові людини і скоригована шляхом множення на величину f_u (частка сполуки, не пов'язана з білками; від англ. fraction of compound unbound to proteins) для людини з експерименту відносно зв'язування з білками плазми крові.

Шлях інгібування в пухлинних клітинах з мутантною формою p13k і с p13k дикого типу

- Здатність сполуки за винаходом інгібувати PI3K-шлях передачі сигналу в пухлинних клітинах оцінювали шляхом вимірювання рівнів p-PRAS40 в лініях HCC1954 (PI3K α з мутацією H1047R) і HDQ-P1 (PI3K α дикого типу), використовуючи методи з прикладу 907. В Таблиці 10 показано, що репрезентативні сполуки 101, 103 і 105 формули I здатні вибірково інгібувати PI3K-шлях в пухлинних клітинах з мутантною формою PI3K α (HCC1954, PI3K α з мутацією H1047R) в порівнянні з пухлинними клітинами з PI3K α дикого типу (HDQ-P1, PI3K α дикого типу). Сполуки 101, 103 і 105 мають більшу селективність відносно мутантної форми в порівнянні з формою

дикого типу, ніж сполуки порівняння - таселісиб, піктилісиб, алпелісиб і сполука 436 (US 8242104).

Таблиця 10

Інгібування p-PRAS40 окремими сполуками в лініях HCC1954 і HDQ-P1

№	EC ₅₀ (мкМ) для p-PRAS40 в HCC1954 MSD	EC ₅₀ (мкМ) для p-PRAS40 в HDQ-P1 MSD	Кратність селективності для HCC1954 відн. HDQ-P1
101	0,019	0,084	4,4
103	0,028	0,155	5,5
105	0,027	0,179	6,6
Таселісиб	0,023	0,055	2,4
Піктилісиб	0,324	0,094	0,3
Алпелісиб	0,483	0,311	0,6
Сполука 436 (US8242104)	0,089	0,122	1,4

5 Деградація p110α в пухлинних клітинах з мутантною формою p13k

Здатність сполуки за винаходом знижувати рівні p110α визначали в експериментах з лініями HCC1954 (PI3Kα з мутацією H1047R) і HDQ-P1 (PI3Kα дикого типу), використовуючи методи з прикладу 905. На Фіг. 3А і 3В показані репрезентативні сполуки 101 і 103 формули I, здатні вибірково стимулювати зниження рівнів p110α в пухлинних клітинах з мутантною формою PI3Kα (HCC1954, з мутацією H1047R) в порівнянні з пухлинними клітинами з PI3Kα дикого типу (HDQ-P1, PI3Kα дикого типу) залежним від концентрації чином. На Фіг. 3А показані дані вестерн-блоттингу, що відображають рівні p110α (p110α, p110-альфа) в клітинах HCC-1954 (PI3Kα з мутацією H1047R) після обробки протягом 24 годин сполукою 101, сполукою 103 і сполукою 436 з US 8242104. На Фіг. 3В показані дані вестерн-блоттингу, що відображають рівні p110α (p110α, p110-альфа) в HDQ-P1 клітинах (PI3Kα дикого типу) після обробки протягом 24 годин сполукою 101, сполукою 103 і сполукою 436 з US 8242104. Сполуки 101 і 103 надають більш сильний вплив на рівні p110α в порівнянні з сполукою 436 (US 8242104).

Багатоденне пероральне введення доз собакам

Здатність сполуки за винаходом стимулювати шлунково-кишкове та/або системне запалення або викликати виснаження лімфоїдної тканини оцінювали з точки зору клінічної та анатомічної патології після багатоденного (7-14 діб) введення доз собакам породи бігль. Сполуки 101 і 103 формули I при більш ніж 5-ти кратному впливі для вільної сполуки в порівнянні з TGI60 (дозою, що викликає інгібування росту пухлин на 60%, в дослідженні ксенотрансплантатної моделі з мутантною формою PI3K) не стимулюють прозапальної картини за результатами оцінки з точки зору клінічної та анатомічної патології (Таблиці 11а, 11b). Аналогічно, сполуки 101 і 103 при високих кратностях впливу викликають лише незначне виснаження лімфоїдної тканини. Навпаки, експерименти з сполуками порівняння таселісибом вказують на значні прозапальні ефекти і значне виснаження лімфоїдної тканини при менш ніж 0,3-кратному впливі для вільної сполуки в порівнянні з TGI60 (Таблиця 11с). Сполука порівняння алпелісиб (BYL-719) і сполука 436 (US 8242104) також викликають запалення і виснаження лімфоїдної тканини в дозах з більш низькими кратностями впливу в порівнянні з сполуками 101 і 103 формули I (Таблиці 11d, 11e). Величина і ступінь достовірності отриманих результатів узгоджуються з посиленням інгібування PI3Kδ (дельта) в дозах, відповідних кратності впливу в порівнянні з IC₅₀, відносно експресії CD69 для сполук порівняння.

Таблиця 11

Багатоденне введення доз собаці сполуки формули I і сполук порівняння
(a)

Сполука 101 Доза мг/кг/ доба 1х/доба	Вплив			Кратність впливу* (заг./вільн., AUC (площа під кривою))	Кратність впливу у порівнянні з IC ₅₀ відн. експресії CD69** (заг., C _{min})	Клініч. ознаки	Клініч. пато- логія ⁺	Гісто- пато- логія ⁺
	AUC _{0-24 г} , 14-а доба (мкМ·г, заг./ вільн.)	C _{max} 14-а доба (мкМ, заг./ вільн.)	C _{min} 14-а доба (мкМ, заг.)					
0,05	0,23/0,16	0,033/0,023	0,0046	0,2х/0,6х	0,07х	-	-	-
0,15	0,87/0,60	0,097/0,067	0,012	0,8х/2,3х	0,2х	-	-	-
0,5	2,0/1,38	0,31/ 0,21	0,017	1,9х/5,3х	0,3х	-	-	-

F_u для собак становить 0,692; F_u для мишей становить 0,252 (F_u означає частку незв'язаної сполуки в зразках плазми крові).

* Кратності впливу з використанням значення TGI₆₀ з 21-денного дослідження на моделі ксенотрансплантатів KPL4; TGI₆₀ дозі 2 мг/кг; загальний вплив 1,04 мкМ·г; вплив для вільної сполуки 0,26 мкМ·г.

** IC₅₀ становить 67 нМ для α-IgM-стимульованої експресії CD69 (в цільній крові).

⁺ Дані, пов'язані із запаленням і лімфоїдними органами.

(b)

Сполука 103 Доза мг/кг/ доба 1х/доба	Вплив			Крат- ність впливу* (заг./ вільн., AUC)	Кратність впливу у порівнянні з IC ₅₀ відн. експресії CD69** (заг., C _{min})	Клініч. ознаки	Клініч. пато- логія ⁺	Гістопато- логія ⁺
	AUC _{0-24 г} , 14-а доба (мкМ·г, заг./ вільн.)	C _{max} 14-а доба (мкМ, заг./ вільн.)	C _{min} 14-а доба (мкМ, заг.)					
0,1	0,27/0,14	0,04/0,02	0,0048	0,2х/4,7х	0,03х	-	-	-
0,3	0,9/0,46	0,13/0,066	0,011	0,8х/15х	0,08х	-	-	-
1	2,54/1,29	0,31/0,16	0,034	2,2х/43х	0,2х	Ано- мальн. фекалії (м'які/ слизові, 4/4).	Лімфо- цити ↓.	Виснажен- ня лімфоїд- ної тканини: тимус.

F_u для собак становить 0,507; F_u для мишей становить 0,03 (F_u означає частку незв'язаної сполуки в зразках плазми крові).

* Кратності впливу з використанням значення TGI₆₀ з 21-денного дослідження TGI на моделі з НСС1954; TGI₆₀ в дозі 3 мг/кг; загальний вплив 1,13 мкМ·г; вплив для вільної сполуки 0,03 мкМ·г.

** IC₅₀ становить 142 нМ для α-IgM-стимульованої експресії CD69 (в цільній крові).

⁺ Дані, пов'язані із запаленням і лімфоїдними органами.

(c)

Таселіс Доза мг/кг/ доба 1х/ доба	Вплив			Кратність впливу* (заг./ вільн., AUC)	Кратн. впливу у порівня- нні з IC ₅₀ відн. експресії CD69** (заг., C _{min})	Клін. ознаки	Клін. пато- логія*	Гістопатологія*
	AUC ₀₋₂₄ г, 7-а доба (мкМ·г, заг./ вільн.)	C _{max} 7-а доба (мкМ, заг./ вільн.)	C _{min} 7-а доба (мкМ, заг.)					
0,3	0,44/0,12	0,07/0,02	0,002	0,1х/0,3х	0,7х	-	-	Виснаження лімфоїдної тканини: лімфатич. вузли, лімфоїдн. тканина, асоційов. з кишечником (GALT), селезінка, тимус. Запалення ШК тракту: шлунок, нейтрофільне запалення.
1	1,6/0,45	0,18/ 0,05	0,019	0,4х/1,0х	6,2х			Виснаження лімфоїдної тканини: лімфатич. вузли, GALT, селезінка, тимус. Запалення ШК тракту: темно- червоні ділянки в шлунку і прямій кишці, що відповідають запаленню в шлунку.

3	5,1/1,4	1,09/0,31	0,016	1,2х/3,2х	5,2х	Втрата маси тіла (BW) (на 7,9% у порівн. із значенням до дослідж.; в основному у 1 собаки); в'ялі, холодні на дотик (вуха); ано-мальн. фекалії; блювота.	Лімфоцити ↓; нейтрофіли ↑; моноцити ↑; глобуліни ↑; співвіднош. А:G (альбумін:глобуліни) ↓; фібриноген ↑.	Виснаження лімфоїдної тканини: лімфатич. вузли, GALT, селезінка, тимус. Запалення ШКТ тракту: темно-червоні ділянки в шлунку і прямій кишці, що відповідають запаленню в шлунку, прямій кишці, сліпій кишці. Системне запалення: нейтрофільні інфільтрати в лімфатич. вузлах, селезінці, тимусі, печінці, легкому, нирці.
---	---------	-----------	-------	-----------	------	--	---	---

F_u для собак становить 0,28; F_u для мишей становить 0,10 (F_u означає частку незв'язаної сполуки в зразках плазми крові).

5 * Кратності впливу з використанням значення TGI_{60} з 21-денного дослідження на моделі ксенотрансплантатів KPL4; TGI_{60} при загальному впливі 4,3 мкМ.г або впливі для вільної сполуки 0,44 мкМ.г.

** IC_{50} становить 3,1 нМ для α -IgM-стимульованої експресії CD69 (в цільній крові).

+ Дані, пов'язані із запаленням і лімфоїдними органами.

10 (d)

Сполука 436 (US 8242104) Доза мг/кг/доба 1х/доба	Вплив			Кратність впливу* (заг./вільн., AUC)	Кратність впливу у порівнянні з IC_{50} відн. експресії CD69** (заг., C_{min})	Клін. ознаки	Клініч. патологія+	Гісто-патологія+
	AUC ₀₋₂₄ г, 7-а доба (мкМ·г, заг./вільн.)	C_{max} 7-а доба (мкМ, заг./вільн.)	C_{min} 7-а доба (мкМ, заг.)					

0,5	3,4/2,3	0,68/0,46	0,016	1,2x/2,3x	0,4x	-	-	Виснажен- ня лімфоїдної тканини: тимус, лімфатич. вузли.
2	15/10,2	2,5/1,7	0,059	5,4x/10,2x	1,3x	-	Фібри- ноген ↑; глобу- ліни ↑.	Виснажен- ня лімфоїдної тканини: тимус, лімфатич. вузли, селезінка, GALT.
6	56/38	6,8/4,6	0,408	20x/38x	9,1x	Втрата BW (на 10% у порівнянні із значен- ням до дослід.). Гіпофунк- ція, рясне слинови- ділення, посилена блювота, аномальні фекалії.	Лімфо- цити ↓; нейтро- філи ↑; фібри- ноген ↑; глобу- ліни ↑.	Виснажен- ня лімфоїдної тканини: тимус, лімфатич. вузли, селезінка, GALT. Запалення ШК тракту: стравохід, шлунок, товста кишка, сліпа кишка. Системне запалення: серце, аорта, оболонки головного мозку.

F_u для собак становить 0,68; F_u для мишей становить 0,36 (F_u означає частку незв'язаної сполуки в зразках плазми крові).

* Кратності впливу з використанням значення TGI_{60} з 21-денного дослідження на моделі ксенотрансплантатів KPL4; TGI_{60} при загальному впливі 2,8 мкМ.г або впливі для вільної сполуки 1,0 мкМ.г.

** IC_{50} становить 45 нМ для а-IgM-стимульованої експресії CD69 (в цільній крові).

+ Дані, пов'язані із запаленням і лімфоїдними органами.

10 (е)

Алпе- лісиб (BYL- 719) Доза мг/кг/ доба 1х/доба	Вплив			Кратність впливу* (заг./ вільн., AUC)	Кратність впливу у порівнянні з IC_{50} відн. експресії CD69** (заг., C_{min})	Клініч. ознаки	Клініч. пато- логія+	Гісто- патологія+
	$AUC_{0-24\text{ г}}$, 7-а доба (мкМ·г, заг./ вільн.)	C_{max} 7-а доба (мкМ, заг./ вільн.)	C_{min} 7-а доба (мкМ, заг.)					
3	14/1,0	1,97/0,14	0,20	0,2x/0,2x	0,3x	-	-	-

10	31,7/2,3	3,58/0,26	0,62	0,4x/0,4x	1,0x	-	Фібриноген ↑.	Запалення ШК тракту: нейтрофільні інфільтрати, товстий кишечник.
30	160/11,5	20,6/1,5	1,25	2,2x/2,0x	2,0x	Апетит ↓, BW ↓ ~ на 10%.	Нейтрофіли ↑; моноцити ↑; глобуліни ↑; фібриноген ↑.	Виснаження лімфоїдної тканини: тимус, лімфатич. вузли, GALT. Запалення ШК тракту: нейтрофільні інфільтрати в товстому і тонкому кишечнику; утворення виразок в прямій кишці.

F_u для собак становить 0,072; F_u для мишей становить 0,082 (F_u означає частку незв'язаної сполуки в зразках плазми крові).

* Кратності впливу з використанням значення TGI_{60} з 21-денного дослідження на моделі ксенотрансплантатів KPL4; TGI_{60} при загальному впливі 72 мкМ.г або впливі для вільної сполуки 5,9 мкМ.г.

** IC_{50} складає 613 нМ для α -IgM-стимульованої експресії CD69 (в цільній крові).

+ Дані, пов'язані із запаленням і лімфоїдними органами.

10 Введення сполук формули I

Сполуки за винаходом можна вводити будь-яким шляхом, відповідно до стану, що піддається лікуванню. Відповідні шляхи включають пероральний, парентеральний (в тому числі підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, інтраартеріальний, інтрадермальний, інтратекальний і епідуральний), трансдермальний, ректальний, назальний, місцевий (в тому числі трансбуккальний і сублінгвальний), вагінальний, внутрішньочеревинний, внутрішньолегеневий та інтраназальний. Що стосується місцевого імуносупресивного лікування, то сполуку можна вводити в область ураження, включаючи перфузію трансплантата інгібітором або інше приведення трансплантата в контакт з інгібітором перед трансплантацією. Очевидно, що переважний шлях може варіювати в залежності, наприклад, від стану реципієнта. Якщо сполука призначена для перорального введення, то на її основі може бути виготовлена композиція у вигляді пігулки, капсули, таблетки і т.д. разом з фармацевтично прийнятним носієм або ексципієнтом. Якщо сполука призначена для парентерального введення, то на її основі може бути виготовлена композиція разом з фармацевтично прийнятним парентеральним розчинником і в стандартній ін'єкційній лікарській формі, як детально описано нижче.

25 Доза для лікування пацієнтів, які є людьми, може змінюватися від приблизно 1 мг до приблизно 1000 мг сполуки формули I. Типова доза може становити від приблизно 10 мг до приблизно 300 мг сполуки. Дозу можна вводити один раз на добу (QD, лат. quaque die), два рази на добу (BID, лат. bis in die) або частіше, залежно від фармакокінетичних і фармакодинамічних властивостей, включаючи всмоктування, розподілення, метаболізм та екскрецію конкретної сполуки. До того ж, на дозування і схему введення можуть впливати фактори, що визначають токсичність. При пероральному введенні пігулку, капсулу або таблетку

можна приймати шляхом проковтування один раз на добу або з меншою частотою протягом визначеного періоду часу. Ця схема може бути повторена для ряду циклів терапії.

Способи лікування сполуками формули I

5 Сполуки формули I за даним винаходом корисні для лікування пацієнта - людини або тварини, яка страждає від захворювання або розладу, обумовленого аномальним клітинним ростом, функціонуванням або характером змін, асоційованим з P13K, таким як рак, який таким чином можна лікувати способом, що включає введення йому сполуки за даним винаходом, визначеним вище. Пацієнта - людину або тварину, що страждає від раку, також можна лікувати способом, що включає введення йому сполуки за даним винаходом, визначеної вище. Тим самим можна нормалізувати або поліпшити стан пацієнта.

10 Способи за винаходом також включають лікування раку, вибраного з раку молочної залози, яєчника, шийки матки, передміхурової залози, яєчка, сечостатевого тракту, стравоходу, гортані, гліобластоми, нейробластоми, раку шлунка, шкіри, кератоакантоми, раку легені, епідермоїдної карциноми, крупноклітинної карциноми, недрібноклітинного раку легені (NSCLC),
15 дрібноклітинної карциноми, аденокарциноми легені, раку кістки, товстої кишки, аденоми, раку підшлункової залози, аденокарциноми, раку щитовидної залози, фолікулярної карциноми, недиференційованої карциноми, папілярної карциноми, семіноми, меланому, саркоми, раку сечового міхура, раку печінки і жовчних проток, раку нирки, панкреатичного раку, мієлоїдних розладів, лімфоми, волосатоклітинному раку, раку щечної порожнини, носоглотки, глотки, губи,
20 язика, порожнини рота, тонкого кишечника, товстої кишки-прямої кишки, товстого кишечника, прямої кишки, головного мозку і центральної нервової системи, хвороби Ходжкіна, лейкозу, раку бронху, щитовидної залози, печінки і жовчних проток, гепатоклітинного раку, шлункового раку, гліоми/гліобластоми, раку ендометрія, меланому, раку нирки і ниркової лоханки, сечового міхура, тіла матки, шийки матки, множинної мієломи, гострого мієлогенного лейкозу, хронічного мієлогенного лейкозу, лімфоцитарного лейкозу, хронічного лімфоїдного лейкозу (CLL),
25 мієлоїдної лейкемії, раку ротоглотки, неходжкінської лімфоми, меланому і ворсинчастої аденоми товстої кишки.

Грунтуючись на даних аналізу експресії, імуногістохімічного аналізу і на профілювання клітинних ліній, можна вважати, що злоякісні новоутворення товстої кишки, молочної залози,
30 шийки матки, шлунка, легені і множинна мієлома з великою часткою ймовірності будуть піддаватися лікуванню модуляторами або інгібіторами P13K.

Винахід відноситься до застосування сполуки, яку описано вище, для лікування раку у пацієнта.

35 Винахід відноситься до застосування сполуки, яку описано вище, для виготовлення лікарського засобу для лікування раку у пацієнта.

Винахід відноситься до сполуки, яку описано вище, для застосування для лікування раку у пацієнта.

40 Винахід відноситься до застосування сполуки, яку описано вище, для лікування раку у пацієнта, при цьому зазначений рак вибраний з раку молочної залози і недрібноклітинного раку легені.

Винахід відноситься до застосування сполуки, яку описано вище, для виготовлення лікарського засобу для лікування раку у пацієнта, при цьому зазначений рак вибраний з раку молочної залози і недрібноклітинного раку легені.

45 Винахід відноситься до сполуки, яку описано вище, для застосування для лікування раку у пацієнта, при цьому зазначений рак вибраний з раку молочної залози і недрібноклітинного раку легені.

Винахід, як його описано вище.

Фармацевтичні композиції

50 Щоб застосувати сполуку за даним винаходом для терапевтичного лікування ссавців, в тому числі людей, зазвичай на її основі виготовляють фармацевтичну композицію відповідно до звичайної фармацевтичної практики. Згідно з цим аспектом винаходу запропонована фармацевтична композиція, що містить сполуку за даним винаходом разом з фармацевтично прийнятним розчинником або носієм.

55 Типову композицію виготовляють шляхом змішування сполуки за даним винаходом і носія, розчинника або ексципієнта. Відповідні носії, розчинники і ексципієнти добре відомі фахівцям в даній області техніки і включають такі речовини, як вуглеводи, воски, розчинні та/або набухаючі у воді полімери, гідрофільні або гідрофобні речовини, желатин, масла, розчинники, вода тощо. Вибір конкретного носія, розчинника або ексципієнта буде залежати від засобу і мети передбачуваного застосування сполуки за даним винаходом. Як правило, розчинники
60 вибирають з розчинників, визнаних фахівцями в даній області техніки нешкідливими (GRAS) для

введення ссавцю. У загальному випадку, нешкідливими розчинниками є нетоксичні водні розчинники, такі як вода та інші нетоксичні розчинники, які розчиняються у воді або змішуються з водою. Відповідні водні розчинники включають воду, етанол, пропіленгліколь, поліетиленгліколі (наприклад, ПЕГ400, ПЕГ300) і т. д. та їх суміші. Композиції також можуть включати в себе одне або більше ніж одне з наступного: буфери, стабілізуючі агенти, поверхнево-активні речовини, зволожуючі агенти, змащувальні речовини, емульгатори, суспензуючі агенти, консерванти, антиоксиданти, агенти, які надають непрозорість, речовини, що сприяють ковзанню, технологічні добавки, барвники, підсолоджувачі, ароматизатори, коригенти та інші відомі допоміжні речовини для забезпечення найкращої презентації лікарського засобу (тобто сполуки за даним винаходом або фармацевтичної композиції на її основі) або для сприяння виробництву лікарського препарату (тобто лікарського засобу).

Композиції можуть бути виготовлені з використанням традиційних методик розчинення і змішування. Наприклад, нерозфасовану лікарську субстанцію (тобто сполуку за даним винаходом або стабілізовану форму сполуки (наприклад, комплекс з похідною циклодекстрину або іншим відомим агентом комплексоутворення)) розчиняють у відповідному розчиннику в присутності одного або більше ексципієнтів, описаних вище. При виготовленні, сполуку за даним винаходом зазвичай вводять до складу фармацевтичних лікарських форм, що забезпечують одержання легко контрольованого дозування лікарського засобу і полегшують дотримання хворим запропонованої схеми лікування.

Фармацевтична композиція (або препарат) для застосування може бути упаковано по-різному в залежності від способу, використовуваного для введення лікарського засобу. У загальному випадку, виріб, призначений для розповсюдження, містить контейнер з розміщеною в ньому фармацевтичної композицією у відповідній формі. Відповідні контейнери добре відомі фахівцям в даній області техніки і включають такі матеріали, як пляшки (пластикові та скляні), саше, ампули, пластикові пакети, металеві циліндричні посудини тощо. Контейнер також може включати в себе блок, що оберігає від невмілого поводження, для попередження необережного доступу до вмісту упаковки. Крім цього, контейнер забезпечений етикеткою з описом вмісту контейнера. Етикетка також може містити відповідні попереджувальні написи.

Фармацевтичні композиції на основі сполук за даним винаходом можуть бути виготовлені для різних шляхів і типів введення. Наприклад, сполуку формули I необхідного ступеня чистоти можливо може бути змішано з фармацевтично прийнятними розчинниками, носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16-е видання, ред. Osol A.) в формі ліофілізованої композиції, подрібненого порошку або водного розчину. Виготовлення композицій може бути здійснено шляхом змішування при температурі навколишнього середовища при відповідному рН і бажаного ступеня чистоти з фізіологічно прийнятними носіями, тобто носіями, які є нетоксичними для реципієнтів в застосовуваних дозах і концентраціях. Величина рН композиції залежить головним чином від конкретного застосування і концентрації сполуки, але може змінюватися в діапазоні від приблизно 3 до приблизно 8. Відповідним втіленням є композиція, виготовлена в ацетатному буфері, при рН 5.

Як правило, сполуку можна зберігати у вигляді твердої композиції, ліофілізованої композиції або у вигляді водного розчину.

Виготовлення, дозування та введення фармацевтичних композицій за даним винаходом буде здійснено способом, що відповідає з належною медичною практикою, тобто з урахуванням кількості, концентрацій, схем, порядку, наявності розріджувачів і шляхів введення. Фактори, що розглядаються в цьому контексті, включають конкретний розлад, що підлягає лікуванню, конкретного ссавця, що підлягає лікуванню, клінічний стан окремого пацієнта, причину розладу, місце доставлення агента, спосіб введення, схему введення та інші фактори, відомі лікарям. "Терапевтично ефективна кількість" сполуки, що підлягає введенню, буде обумовлена такого роду міркуваннями і становить мінімальну кількість, необхідну для зменшення інтенсивності симптомів або лікування гіперпроліферативних розладів.

З загальних міркувань початкова фармацевтично ефективна кількість інгібітора, що вводиться парентерально, з розрахунку на одну дозу буде перебувати в діапазоні приблизно 0,01-100 мг/кг, а саме, від приблизно 0,1 до 20 мг/кг маси тіла пацієнта на добу, при цьому типовий початковий діапазон для використовуваної сполуки становить 0,3-15 мг/кг/доба.

Прийнятні розріджувачі, носії, наповнювачі і стабілізатори нетоксичні для реципієнтів в застосовуваних дозах і концентраціях і включають буфери, наприклад, на основі фосфату, цитрату та інших органічних кислот; антиоксиданти, в тому числі аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметонійхлорид; бензалконійхлорид, бензетонійхлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропіл-парабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-

пентанол і м-крезол); низькомолекулярні (менше ніж приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота); цукри, такі як сахароза, манніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як іон натрію; комплекси з металами (наприклад, комплекси Zn-білок); та/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN™, PLURONICS™ або поліетиленгліколь (ПЕГ). Крім того, активні фармацевтичні інгредієнти можуть бути укладені в мікрокапсули, приготовані, наприклад, з використанням методів коацервації або шляхом міжфазної полімеризації, наприклад, в мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатину і мікрокапсули з полі-(метилметакрилату), відповідно, в колоїдні системи лікарського доставлення (наприклад, ліпосоми, мікросфери альбуміну, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^e видання, ред. Osol A. (1980).

На основі сполук формули I можна виготовити препарати з тривалим вивільненням. Відповідні приклади препаратів з тривалим вивільненням включають напівпроникні матриці з гідрофобних полімерів у твердій формі, що містять сполуки формули I, причому ці матриці існують у формі штампованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Приклади матриць з тривалим вивільненням включають складні полієфіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксietил-метакрилат) або полі(вініловий спирт)), полілактиди (US 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти і гамма-етил-L-глутамату, етилен-вінілацетат, що не розкладається, співполімери молочної кислоти, що розкладаються і гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT™ (ін'єктовані мікросфери, що складаються з співполімера молочної кислоти і гліколевої кислоти і з ацетату лейпроліду), і полі-D-(-)-3-гідроксимасляну кислоту.

Дані композиції включають композиції, які підходять для шляхів введення, докладно викладених в даному описі. Може бути зручним представлення композицій в стандартній лікарській формі, і вони можуть бути виготовлені будь-яким із способів, добре відомих в області фармацевтики. Методи і композиції зазвичай можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Такі способи включають стадію приведення активного інгредієнта в асоціацію з носієм, який складається з одного або більше додаткових інгредієнтів. У загальному випадку композиції виготовляють шляхом безперервного і рівномірного приведення активного інгредієнта в асоціацію з рідкими носіями або тонкоподрібненими твердими носіями або ними обома і потім, при необхідності, надання форми продукту.

Композиції на основі сполуки формули I, придатні для перорального введення, можуть бути виготовлені у вигляді дискретних одиниць, таких як пігулки, капсули, облатки або таблетки, кожна з яких містить попередньо задану кількість сполуки формули I. Пресовані таблетки можуть бути виготовлені в відповідній машині шляхом пресування активного інгредієнта в вільно плинній формі, такої як порошок або гранули, можливо в суміші з речовиною, змащуючою речовиною, інертним розчинником, консервантом, поверхнево-активним або диспергуючим агентом. Формовані таблетки можуть бути виготовлені в відповідній машині шляхом формування суміші порошкоподібного активного інгредієнта, зволоженого інертним рідким розріджувачем. Можливо, що таблетки можуть мати покриття або риску і можливо можуть бути виготовлені таким чином, щоб забезпечити повільне або регульоване вивільнення з неї активного інгредієнта. Для перорального застосування можна виготовити таблетки, коржички, пастилки, водні або масляні суспензії, диспергуючі порошки або гранули, емульсії, тверді або м'які капсули, наприклад желатинові капсули, сиропи або еліксири. Композиції на основі сполуки формули I, призначені для перорального застосування, можуть бути виготовлені відповідно до будь-якого способу, відомого в області виготовлення фармацевтичних композицій, і такі композиції можуть містити один або більше агентів, включаючи підсолоджувачі, коригенти, барвники і консерванти, з метою надання препарату приємного смаку. Прийнятними є таблетки, що містять активний інгредієнт в суміші з нетоксичним фармацевтично прийнятним ексципієнтом, відповідним для виготовлення таблеток. Цими ексципієнтами можуть бути, наприклад, інертні розріджувачі, такі як карбонат кальцію або натрію, лактоза, фосфат кальцію або натрію; гранулюючі і розпушуючі агенти, такі як кукурудзяний крохмаль або альгінова кислота; сполучні речовини, такі як крохмаль, желатин або аравійська камінь; і змащувальні речовини, такі як стеарат магнію, стеаринова кислота або тальк. Таблетки можуть не мати покриття або можуть бути покриті оболонкою з використанням відомих методів, включаючи мікроінкапсулювання, для затримки розпадання і всмоктування в шлунково-кишковому тракті і тим самим для забезпечення тривалої дії протягом більшого

періоду часу. Наприклад, можна використовувати таку речовину-сповільнювач, як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат, самі по собі або разом з воском.

Для лікування очних або інших зовнішніх тканин, наприклад, порожнини рота і шкіри, переважно застосовують композиції у вигляді мазі або крему для місцевого застосування, що містять активний(і) інгредієнт(и) в кількості, наприклад, 0,075-20 % мас./мас. При виготовленні композиції у вигляді мазі активні інгредієнти можуть бути використані або з парафіну, або зі змішаною з водою мазевою основою. Альтернативно, на основі активних інгредієнтів можуть бути виготовлені композиції у вигляді крему з використанням основи для крему типу олія-у-воді. При бажанні водна фаза основи для крему може включати багатоатомний спирт, тобто спирт, який має дві або більше ніж дві гідроксильні групи, такий як пропіленгліколь, бутан-1,3-діол, манніт, сорбіт, гліцерин і поліетиленгліколь (включаючи ПЕГ400) та їх суміші. Композиції для місцевого застосування при бажанні можуть включати в себе сполуку, яка підсилює всмоктування або проникнення активного інгредієнта через шкіру або інші зони впливу. Приклади таких підсилювачів проникнення через шкіру включають диметилсульфоксид і родинні аналоги. Масляна фаза емульсій за даним винаходом може бути складена з відомих інгредієнтів відомим чином. При тому, що ця фаза може містити тільки емульгатор, бажано, щоб вона містила суміш щонайменше одного емульгатора з жиром або маслом або і з жиром, і з маслом обома. Переважно, гідрофільний емульгатор включають разом з ліпофільним емульгатором, який діє як стабілізатор. Також бажано включення до складу як масла, так і жиру. Емульгатор(и) спільно зі стабілізатором(ами) або без нього(них) утворюють так званий емульгуючий віск, і цей віск разом з маслом і жиром становить так звану емульгуючу мазеву основу, яка утворює масляну дисперсійну фазу композицій в формі крему. Емульгатори і стабілізатори емульсій, які підходять для використання в композиції за винаходом, включають Tween® 60, Span® 80, цетостеариловий спирт, бензиловий спирт, міристиловий спирт, гліцерилмоностеарат і лаурилсульфат натрію.

Водні суспензії сполук формули I містять активні речовини в суміші з ексципієнтами, придатними для виготовлення водних суспензій. Такі ексципієнти включають суспендуючий агент, такий як карбоксиметилцелюлози натрієва сіль, кроскармелоза, повідон, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, альгінат натрію, полівінілпіролідон, трагакантова камідь і аравійська камідь, і диспергуючі або зволожуючі агенти, такі як природні фосфатиди (наприклад, лецитин), продукт конденсації алкіленоксиду з жирними кислотами (наприклад, поліоксіетиленстеарат), продукт конденсації етиленоксиду з довголанцюговим аліфатичним спиртом (наприклад, гептадекаетиленокси-цетанол), продукт конденсації етиленоксиду з неповним складним ефіром, що є похідною жирної кислоти і ангідриду гекситу (наприклад, поліоксіетиленсорбітан-моноолеат). Водна суспензія також може містити один або більше консервантів, таких як етил- або н-пропіл-пара-гідроксibenзоат, один або більше барвників, один або більше коригентів і один або більше підсолоджувачів, таких як сахароза або сахарин.

Фармацевтичні композиції на основі сполук формули I можуть бути в формі стерильного препарату для ін'єкцій, такого як стерильна водна або масляна суспензія для ін'єкцій. Ця суспензія може бути виготовлена відповідно до відомих в даній області техніки способам з використанням таких потрібних диспергуючих або зволожуючих агентів і суспендуючих агентів, які згадані вище. Стерильний препарат для ін'єкцій також може являти собою стерильний ін'єкційний розчин або стерильну ін'єкційну суспензію в нетоксичному прийнятному для парентерального введення розчиннику або розчиннику, як наприклад, розчин у 1,3-бутандіолі, або може бути виготовлений з ліофілізованого порошку. Серед прийнятних розріджувачів і розчинників, які можуть бути використані, знаходиться вода, розчин Рінгера та ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім цього, в якості розчинника або суспендуючого середовища традиційно можна використовувати стерильні нелетючі масла. Для цієї мети може бути використано будь-яке малов'язке нелетюче масло, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. На додаток до цього, у виготовленні ін'єкційних засобів таким же чином можуть бути використані жирні кислоти, такі як олеїнова кислота.

Кількість активного інгредієнта, яку можна комбінувати з речовиною-носієм для виготовлення разової лікарської форми, буде варіювати в залежності від реципієнта, що піддається лікуванню, і конкретного способу введення. Наприклад, композиція з уповільненим вивільненням, призначена для перорального введення людям, може містити приблизно 1-1000 мг активної речовини в суміші з відповідною і зручною кількістю речовини-носія, яка може варіювати від приблизно 5 до приблизно 95 % від маси всієї композиції (маса:маса). Фармацевтична композиція може бути виготовлена таким чином, щоб безперешкодно забезпечити введення вимірюваної кількості. Наприклад, водний розчин, призначений для внутрішньовенної інфузії, може містити від приблизно 3 до 500 мкг активного інгредієнта на

один мілілітр розчину з тим, щоб можна було здійснювати інфузію відповідного об'єму зі швидкістю приблизно 30 мл/г.

Композиції, які підходять для парентерального введення, включають водні і неводні стерильні розчини для ін'єкцій, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатичні засоби і розчинені речовини, які роблять композицію ізотонічної крові передбачуваного реципієнта; і водні та неводні стерильні суспензії, які можуть включати в себе суспендуючі агенти та загусники.

Композиції, які підходять для місцевого введення в око, також включають очні краплі, де активний інгредієнт розчинений або суспендований в потрібному носії, зокрема, у водному розчиннику для активного інгредієнта. Активний інгредієнт переважно присутній в таких композиціях в концентрації приблизно 0,5-20 % мас./мас., наприклад, приблизно 0,5-10 % мас./мас., наприклад, приблизно 1,5 % мас./мас.

Композиції, які підходять для місцевого введення в порожнину рота, включають пастилки, що містять активний інгредієнт в ароматизованій основі, зазвичай сахарозі і аравійській каміді або трагаканті; пастилки, що містять активний інгредієнт в інертній основі, такої як желатин і гліцерин або сахароза і аравійська камідь; і рідини для полоскання рота, що містять активний інгредієнт в потрібному рідкому носії.

Композиції для ректального введення можуть бути представлені у вигляді супозиторія з відповідною основою, що містить, наприклад масло какао або саліцилат.

Композиції, які підходять для внутрішньонозальнового або назального введення, мають розмір частинок, наприклад, в діапазоні 0,1-500 мікрон (в тому числі розміри частинок в діапазоні від 0,1 до 500 мікрон з таким кроком, як 0,5, 1, 30 мікрон, 35 мікрон і т. д.), які вводять за допомогою швидкої інгаляції через носовий прохід або за допомогою інгаляції через рот, щоб досягти альвеолярних мішечків. Відповідні композиції включають водні або масляні розчини активного інгредієнта. Композиції, які підходять для введення аерозолі або сухого порошку, можуть бути виготовлені традиційними способами і можуть бути доставлені разом з іншими терапевтичними агентами, такими як сполуки, що до сих пір використовуються в лікуванні або профілактиці розладів, які описані нижче.

Композиції, які підходять для вагінального введення, можуть бути представлені у вигляді композицій в формі песаріїв, тампонів, кремів, гелів, паст, пінок або спрею, що містять крім активного інгредієнта такі носії, доцільність використання яких в даній області техніки відома.

Композиції можуть бути упаковані в однодозові або багатодозові контейнери, наприклад, герметично закриті ампули і флакони, та їх можна зберігати у висушеному сублімаційним сушінням (ліофілізованому) стані, що вимагає тільки додавання стерильного рідкого носія, наприклад води, для ін'єкцій безпосередньо перед застосуванням. Екстемпоральні розчини і суспензії для ін'єкцій готують з стерильних порошоків, гранул і таблеток описаного раніше типу. Переважними стандартними дозованими лікарськими формами є такі, які містять добову дозу або стандартну добову субдозу активного інгредієнта, як у даному описі вище, або відповідну її частку.

Згідно винаходу також запропоновані ветеринарні композиції, що містять щонайменше один активний інгредієнт, який визначений вище, разом з прийнятним в ветеринарії відповідним носієм. Прийнятними в ветеринарії носіями є речовини, корисні для введення композиції, і вони можуть бути твердими, рідкими або газоподібними речовинами, які в іншому інертні або прийнятні в області ветеринарії і сумісні з активним інгредієнтом. Ці ветеринарні композиції можна вводити парентерально, перорально або будь-яким іншим бажаним шляхом.

Комбінована терапія

Сполуки формули I можуть бути застосовані окремо або в комбінації з додатковими терапевтичними агентами для лікування захворювання або розладу, описаного в даній заявці, такого як запалення або гіперпроліферативний розлад (наприклад, рак). У деяких втіленнях сполуки формули I об'єднують у фармацевтичній комбінованій композиції, або схемі введення у вигляді комбінованої терапії, з додатковою, другою терапевтичною сполукою, яка має протизапальні або антигіперпроліферативні властивості, або такою сполукою, яка корисна для лікування запалення, порушення імунної системи або гіперпроліферативного розладу (наприклад, раку). Додатковим терапевтичним агентом може бути інгібітор Bcl-2, інгібітор JAK, протизапальний агент, імуномодуючий агент, хіміотерапевтичний агент, підсилювач апоптозу, нейротропний фактор, агент для лікування серцево-судинного захворювання, агент для лікування захворювання печінки, противірусний агент, агент для лікування захворювання крові, агент для лікування діабету і агент для лікування імунодефіцитних станів. Другим терапевтичним агентом може бути протизапальний агент NSAID (нестероїдний протизапальний лікарський засіб). Другим терапевтичним агентом може бути хіміотерапевтичний агент. Друга

сполука в такій фармацевтичній комбінованій композиції або схемі введення переважно має взаємодоповнюючі активності по відношенню до сполуки формули I, такі, що вони не роблять несприятливого впливу друг на друга. Такі сполуки відповідно присутні в комбінації в кількостях, ефективних для передбачуваного завдання. В одному з втілень композиція за даним винаходом містить сполуку формули I або її стереоізомер, таутомер, сольват, метаболіт або фармацевтично прийнятну сіль або їх проліки в комбінації з таким терапевтичним агентом, як NSAID.

Введення при комбінованій терапії може бути здійснено за одночасною або послідовною схемою. У разі послідовного введення комбінація може бути введена за два або більше ніж два рази. Введення при комбінованій терапії включає спільне введення, при якому використовуються окремі композиції або єдина фармацевтична композиція, і послідовне введення в будь-якому порядку, при якому, переважно, є період часу, коли обидва активних агента (або всі активні агенти) одночасно проявляють свої біологічні активності.

Відповідними дозуванням для будь-якого з вищезазначених, що вводяться спільно агентів, є дозування, використовувані в даний час, і вони можуть бути знижені внаслідок поєднаної дії (синергізму) нового ідентифікованого агента та інших терапевтичних агентів або схем лікування.

Комбінована терапія може забезпечувати "синергізм" і проявляти "синергетичний характер", тобто ефект, який досягається при спільному використанні активних інгредієнтів, більше суми ефектів, одержуваних в результаті використання цих сполук окремо. Синергетичний ефект може бути отриманий тоді, коли активні інгредієнти: (1) спільно включають до складу композиції при її виготовленні і вводять або доставляють одночасно в комбінованій, стандартній дозованій лікарській формі; (2) доставляють шляхом чергування або паралельно у вигляді окремих композицій; або (3) доставляють з використанням будь-якої іншої схеми (введення). При доставленні з використанням чергової терапії синергетичний ефект може бути отриманий тоді, коли сполуку вводять або доставляють послідовно, наприклад, за допомогою різних ін'єкцій в окремих шприцах, окремих таблетках або капсулах або окремих крапельницях. У загальному випадку, при чергованій терапії ефективну дозування кожного активного інгредієнта вводять послідовно, тобто, серіями, тоді як при комбінованій терапії ефективні дозування двох або більше активних інгредієнтів вводять спільно.

У конкретному втіленні, що відноситься до терапії, сполука формули I або її стереоізомер, таутомер, сольват, метаболіт або фармацевтично прийнятна сіль або їх проліки можуть бути скомбіновані з іншими терапевтичними агентами, гормональними агентами або агентами на основі антитіл, як наприклад, агенти, описані в даній заявці, а також скомбіновані з хірургічною терапією і променевою терапією. Таким чином, комбіновані терапії за даним винаходом включають введення щонайменше одної сполуки формули I або її стереоізомеру, таутомеру, сольвату, метаболіту або фармацевтично прийнятної солі або їх проліків і застосування щонайменше одного або більше ніж одного іншого способу лікування раку. Кількості сполук(и) формули I та іншого(их) фармацевтичні активного(их) терапевтичного(их) агента(ів) і відносні тимчасові інтервали введення будуть вибрані з метою досягнення бажаного комбінованого терапевтичного ефекту.

Додаткові терапевтичні агенти, які застосовуються в комбінації з сполукою формули I, включають 5-FU, доцетаксел, ерибулін, гемцитабін, кобіметиніб, іпатасертиб, паклітаксел, тамоксифен, фулвестрант, GDC-0810, дексаметазон, палбоцикліб, бевацизумаб, пертузумаб, трастузумабу емтанзин, трастузумаб і летрозол.

Метаболіти сполук формули I

Крім того, в об'єм даного винаходу включені продукти метаболізму *in vivo* сполук формули I, описаних в даній заявці. Такі продукти можуть одержуватися зі сполуки, що вводиться, наприклад, в результаті її окислення, відновлення, гідролізу, амідування, дезамідування, етерифікації, деетерифікації, ферментативного розщеплення і тому подібного. Відповідно, винахід включає метаболіти сполук формули I, в тому числі сполук, одержуваних способом, що включає приведення сполуки за даним винаходом в контакт з ссавцем протягом періоду часу, достатнього для одержання продукту його метаболізму.

Продукти метаболізму зазвичай ідентифікують за допомогою одержання міченого радіоактивним (наприклад, ^{14}C или ^3H) ізотопом сполуки за винаходом, введення його парентеральним способом в детектованій дозі (наприклад, більше ніж приблизно 0,5 мг/кг) тварині, такої як щур, миша, морська свинка, мавпа, або людині, з забезпеченням достатнього для здійснення метаболізму часу (зазвичай приблизно від 30 секунд до 30 годин) і виділення продуктів його перетворення з сечі, крові або інших біологічних зразків. Ці продукти легко виділити, оскільки вони є міченими (інші виділяють за допомогою застосування антитіл, здатних до зв'язування з епітопами, що збереглися в метаболіті). Структури метаболітів визначають

традиційним чином, наприклад, аналізом з використанням мас-спектрометрії (MS), рідинної хроматографії в поєднанні з MS (LC/MS) або ядерного магнітного резонансу (ЯМР). У загальному випадку, аналіз метаболітів здійснюють так само, як і традиційні дослідження метаболізму лікарських засобів, добре відомі фахівцям в даній області техніки. Продукти метаболізму, за умови, що в інших випадках вони не виявляються *in vivo*, корисні в діагностичних аналізах для визначення терапевтичної дози сполук за винаходом.

Виріб виробництва

В іншому втіленні винаходу запропоновано виріб виробництва або "набір", що містять речовини, корисні для лікування описаних вище захворювань і розладів. В одному з втілень набір включає в себе контейнер, що містить сполуку формули I або її стереоізомер, таутомер, сольват, метаболіт або фармацевтично прийнятну сіль або їх проліки. Крім того, набір може містити етикетку або інструкцію із застосування, що знаходиться на контейнері або разом з ним. Термін "інструкція із застосування" зазвичай відноситься до інструкцій, що традиційно включаються в комерційні упаковки терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, протипоказання та/або попередження щодо застосування таких терапевтичних продуктів. Відповідні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, блістерну упаковку і т. д. Контейнер може бути зроблений з різноманітних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер може включати в себе сполуку формули I або композицію на її основі, які ефективні для лікування вказаного стану, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може являти собою мішечок або флакон для внутрішньовенних розчинів, що має пробку, піддається проколюванню голкою для підшкірних ін'єкцій). Щонайменше одним активним агентом в композиції є сполука формули I. На етикетці або в інструкції по застосуванню вказується, що дану композицію застосовують для лікування вибраного стану, такого як рак. Крім цього, на етикетці або в інструкції по застосуванню може бути зазначено, що підлягаючий лікуванню пацієнт є пацієнтом з таким розладом, як гіперпроліферативний розлад, нейродегенерація, гіпертрофія серця, біль, мігрень або нейротравматичне захворювання або подія. В одному з втілень на етикетці або в інструкціях по застосуванню вказується, що композицію, яка містить сполуку формули I, можна використовувати для лікування розладу, що є результатом аномального клітинного росту. На етикетці або в інструкції по застосуванню також може бути зазначено, що дану композицію можна використовувати для лікування інших розладів. Альтернативно або крім цього такий виріб виробництва може додатково включати в себе другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера та розчин глюкози. Крім того, він може включати в себе інші матеріали, які підходять з комерційної точки зору і точки зору споживача, в тому числі інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Набір може додатково містити вказівки щодо введення сполуки формули I і другої фармацевтичної композиції, якщо вона присутня. Наприклад, якщо набір включає в себе першу композицію, що містить сполуку формули I, і другу фармацевтичну композицію, то такий набір може додатково містити вказівки щодо одночасного, послідовного або роздільного введення першої і другої фармацевтичних композицій потребуючому цього пацієнту.

В іншому втіленні набори підходять для доставлення твердих пероральних форм на основі сполуки формули I, таких як таблетки або капсули. Такий набір переважно містить ряд стандартних доз. Такі набори можуть включати в себе картку з дозуванням, розташованими в порядку їх передбачуваного застосування. Прикладом такого набору є "блістер". Блістерні упаковки добре відомі в пакувальній індустрії і широко використовуються для пакування фармацевтичних стандартних лікарських форм. При бажанні може бути надана пам'ятка, наприклад, у вигляді чисел, букв або інших маркувань або з календарем-вкладишем, де вказані дні в схемі лікування, в які можна вводити дозування.

Відповідно до одного з втілень набір може включати в себе (a) перший контейнер із сполукою формули I, що міститься в ньому; і можливо (b) другий контейнер з другою фармацевтичною композицією, що міститься в ньому, при цьому друга фармацевтична композиція містить другу сполуку, що має антигіперпроліферативну активність. Альтернативно або крім цього набір може додатково включати в себе третій контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера та розчин глюкози. Крім того, він може включати в себе інші матеріали, які підходять з комерційної точки зору і точки зору споживача, в тому числі інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

У деяких інших втіленнях, де набір включає в себе композицію на основі сполуки формули I і другий терапевтичний агент, такий набір може містити контейнер для вміщення в нього окремих

композицій, такий як розділена пляшка або розділений пакет з фольги, однак, окремі композиції також можуть міститися в єдиному нерозділеному контейнері. Зазвичай, набір містить вказівки щодо введення окремих компонентів. Форма набору має особливу перевагу в тих випадках, коли окремі компоненти переважно вводять в різних лікарських формах (наприклад, пероральній і парентеральній), що вводять з різними інтервалами дозування або в тих випадках, коли згідно з рекомендацією лікаря бажано провести титрування індивідуальних компонентів комбінації.

Одержання сполук формули I

Сполуки формули I можуть бути синтезовані з використанням шляхів синтезу, що включають способи, аналогічні добре відомим в області хімії, зокрема, з урахуванням опису, що міститься в даній заявці, і способи, які використовуються для синтезу інших гетероциклічних сполук, описані в роботах: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, редактори Katritzky і Rees, Elsevier, 1997, наприклад в томі 3; *Liebigs Annalen der Chemie*, (9): 1910-16, (1985); *Helvetica Chimica Acta*, 41: 1052-60, (1958); *Arzneimittel-Forschung*, 40(12): 1328-31, (1990), кожна з яких явно включена за допомогою посилання. Зазвичай, вихідні речовини набувають в комерційних джерелах, таких як Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), або легко одержують, використовуючи методи, добре відомі фахівцям в даній області техніки (наприклад, одержують способами, в цілому описаними в Louis F. Fieser and Mary Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, v. 1-23, Wiley, NY (вид. 1967-2006 p.p.) або Beilsteins *Handbuch der organischen Chemie*, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin, включаючи додатки (також доступні через онлайн-базу даних Бейльштейна).

Методології хімічних перетворень в ході синтезу і використання захисних груп (введення і видалення захисту), корисні в синтезі сполук формули I, і необхідні реагенти і проміжні сполуки відомі в даній області техніки і включають, наприклад, такі, описані в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley and Sons (1999); і L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) та в їх подальших виданнях.

У розділі Приклади наведені типові способи одержання сполук формули I. Фахівцям в даній області техніки буде очевидно, що для синтезу сполук формули I можна використовувати й інші шляхи синтезу. Хоча на фігурах і в розділі Приклади зображені й описані конкретні вихідні речовини і реагенти, вони можуть бути легко замінені на інші вихідні речовини і реагенти для одержання цілого ряду похідних та/або реакційних умов. Крім цього, чимало типових сполук, одержаних описаними способами, може бути додатково модифіковано з урахуванням даного опису з використанням загальноприйнятих методів хімії, добре відомих фахівцям в даній області техніки.

При одержанні сполук формули I може знадобитися захист функціональної групи (наприклад, первинного або вторинного аміну) в проміжних сполуках. Необхідність такого захисту буде варіювати в залежності від природи такої функціональної групи і умов способів одержання. Відповідні аміно-захисні групи включають ацетил, трифторацетил, трет-бутоксикарбоніл (BOC), бензилоксикарбоніл (CBz) і 9-флуоренілметиленоксикарбоніл (Fmoc). Необхідність такого захисту легко визначається фахівцем в даній області техніки. Загальний опис захисних груп та їх застосування див. в T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

У способах одержання сполук формули I переважим може бути відділення продуктів реакції один від одного та/або від вихідних речовин. Бажані продукти з кожної стадії або серії стадій розділяють та/або очищають до бажаного ступеня гомогенності методами, загальновідомими в даній області техніки. Зазвичай такі методи розділення включають в себе багатofазну екстракцію, кристалізацію з розчинника або суміші розчинників, дистиляцію, сублімацію або хроматографію. Хроматографія може включати в себе будь-яку кількість методів, в тому числі, наприклад: обернено-фазову і нормально-фазову; гель-проникаючу; іонообмінну хроматографію; методи і пристрій для рідинної хроматографії високого, середнього та низького тиску; дрібномасштабну аналітичну хроматографію; хроматографію з псевдорухомим шаром (SMB) і препаративну тонкошарову і товстошарову хроматографію, а також методи дрібномасштабної тонкошарової та флеш-хроматографії.

Інший клас методів розділення включає обробку суміші реагентом, вибраним для зв'язування з бажаним продуктом, що не прореагував з вихідною речовиною, побічним продуктом реакції або тому подібним або таким, що впливає на все перераховане вище інакше, сприяючи розділенню. Такі реагенти включають адсорбенти або абсорбенти, як наприклад, активоване вугілля, молекулярні сита, іонообмінні середовища або тому подібне. Альтернативно, такими реагентами можуть бути кислоти в разі основної речовини, основи в разі

кислотної речовини, зв'язуючі реагенти, такі як антитіла, зв'язуючі білки, селективні хелатори, такі як краун-ефіри, реагенти для рідина/рідинної іонної екстракції (LIX) або тому подібне. Вибір відповідних методів розділення залежить від природи розглянутих речовин, наприклад, від точки кипіння і молекулярної маси при дистиляції і сублімації, присутності або відсутності

полярних функціональних груп при хроматографії, стабільності речовин в кислотних і лужних середовищах при багатофазній екстракції і тому подібного.

Діастереомерні суміші можуть бути розділені на свої індивідуальні діастереомери на основі відмінностей їх фізико-хімічних властивостей методами, добре відомими фахівцям в даній області техніки, наприклад, за допомогою хроматографії та/або фракційної кристалізації.

Енантіомери можна розділити шляхом перетворення енантіомерної суміші в діастереомерну суміш в результаті взаємодії з відповідною оптично активною сполукою (наприклад, хіральною допоміжною речовиною, такою як хіральний спирт або хлорангідрид кислоти Мошера), розділення діастереомерів і перетворення (наприклад, за допомогою гідроліза) індивідуальних діастереоізомерів у відповідні чисті енантіомери. Крім того, деякі сполуки даного винаходу можуть бути атропоізомерами (наприклад, заміщені біарили), і вони розглядаються як частина даного винаходу. Енантіомери також можуть бути розділені з застосуванням колонки для хіральної HPLC (high pressure liquid chromatography).

Індивідуальний стереоізомер, наприклад енантіомер, який по суті не містить свого стереоізомеру, можна одержати шляхом розділення рацемічної суміші, використовуючи такий

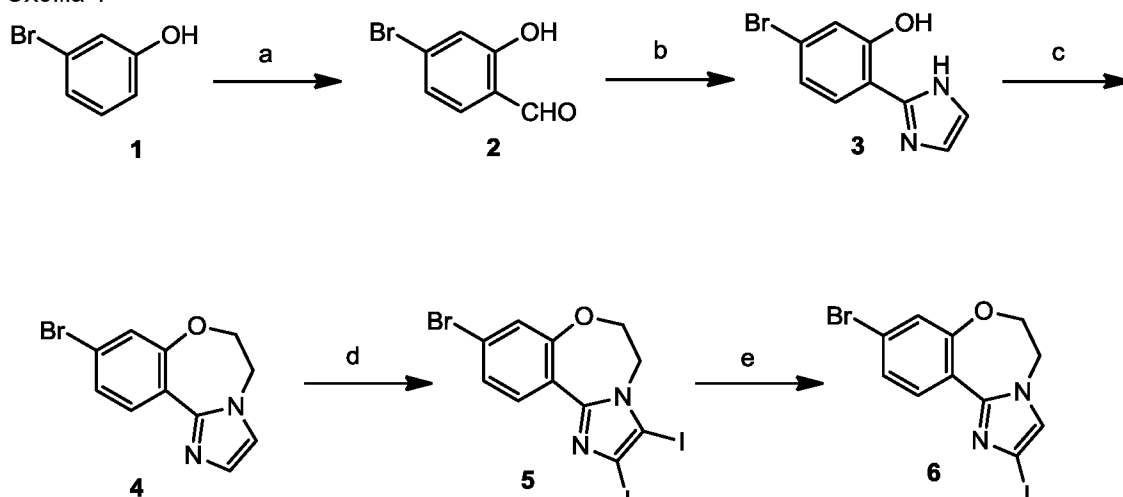
метод, як утворення діастереомерів із застосуванням оптично активних розділяючих агентів (Eliel E. and Wilen S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994; Lochmuller CH (1975) J. Chromatogr., 113 (3): 283-302). Рацемічні суміші хіральних сполук за винаходом можуть бути розділені і сполуки виділені будь-яким відповідним методом, включаючи: (1) утворення іонних діастереомерних солей з хіральними сполуками і розділення фракційною кристалізацією або іншими методами, (2) утворення діастереомерних сполук з використанням хіральних дериватизуючих реагентів, розділення діастереомерів і перетворення в чисті стереоізомери і (3) розділення по суті чистих або збагачених стереоізомерів безпосередньо в хіральних умовах. Див.: "Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology", Irving W. Wainer, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1993).

Згідно з методом (1) діастереомерні солі можуть бути утворені в результаті взаємодії енантіомерно чистих хіральних основ, таких як бруцин, хінін, ефедрин, стрихнін, α -метил- β -фенілетиламін (амфетамін) і тому подібне, з асиметричними сполуками, що несуть кислотну функціональну групу, таку як група карбонової кислоти та сульфонової кислоти. Розділення діастереомерних солей можна здійснити фракційною кристалізацією або іонообмінною хроматографією. Що стосується розділення оптичних ізомерів аміносполук, то до утворення діастереомерних солей може призводити додавання хіральних карбонових або сульфонових кислот, таких як камфорсульфонова кислота, винна кислота, мигдальна кислота або молочна кислота.

Альтернативно, згідно з методом (2) підлягаючи розділенню речовину приводять у взаємодію з одним з енантіомерів хіральної сполуки з утворенням діастереомерної пари (Eliel E. and Wilen S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994 p. 322). Діастереомерні сполуки можуть утворюватися в результаті взаємодії асиметричної сполуки з енантіомерно чистими хіральними дериватизуючими реагентами, такими як ментильні похідні, з наступним розділенням діастереомерів і гідролізом з одержанням чистого або збагаченого енантіомера. Метод визначення оптичної чистоти включає в себе одержання хіральних складних ефірів, таких як складний ментильний ефір, наприклад (-)-ментил-хлорформіат, в присутності основи, або ефір Мошера, α -метокси- α -(трифторметил) фенілацетат (Jacob III, J. Org. Chem. (1982) 47: 4165), в рацемічній суміші і аналіз ^1H ЯМР-спектра на наявність двох атропоізомерних енантіомерів або діастереомерів. Стабільні діастереомери атропоізомерних сполук можна розділити і виділити нормально-фазовою та обернено-фазовою хроматографією, слідуючи способам розділення атропоізомерних нафтил-ізохінолінів (WO 96/15111). Згідно з методом (3) рацемічну суміш двох енантіомерів можна розділити хроматографією з використанням хіральної нерухомої фази ("Chiral Liquid Chromatography" (1989), WJ Lough, Ed., Chapman and Hall, New York; Okamoto, J. Chromatogr. (1990) 513: 375-378). Збагачені або очищені енантіомери можна розрізнити методами, використовуваними для розрізнення інших хіральних молекул з асиметричними атомами вуглецю, такими як оптичне обертання і круговий дихроїзм.

Сполуки за винаходом одержували так, як проілюстровано на загальних схемах 1 та 2.

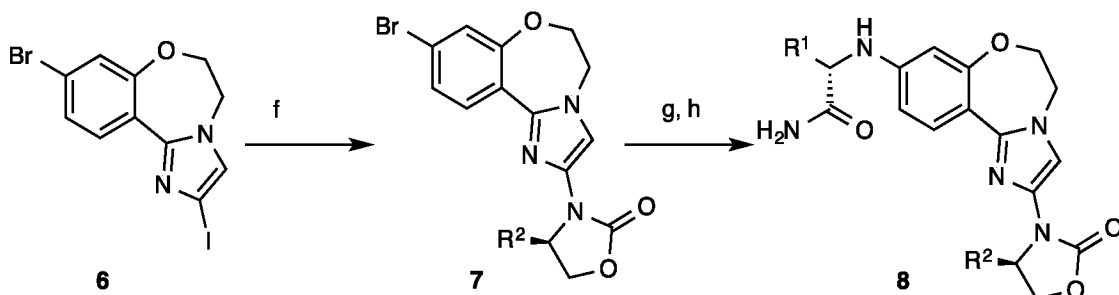
Схема 1



а) MgCl_2 , триетиламін, параформальдегід, ацетонітрил, нагрівання; б) оксальдегід, гідроксид амонію, нагрівання; с) карбонат цезію, 1,2-диброметан, DMF (диметилформамід), нагрівання; д) N-йодсукцинімід, DMF, нагрівання; е) 1. EtMgBr , THF (тетрагідрофуран), -20°C ; 2. водний розчин хлориду амонію.

Як показано на схемі 1, 4-бром-2-гідроксибензальдегід 2 може бути одержаний шляхом формілювання наявного в продажу 3-бромфенолу. Після нагрівання сполуки 2 з оксальдегідом і гідроксидом амонію одержують сполуку 3. Оксазепінове кільце може бути утворено в результаті нагрівання сполуки 3 з 1,2-диброметаном. Біс-йодинування може бути індуковано шляхом взаємодії з N-йодсукцинімідом, а група 3-йод може бути вибірково видалена шляхом обробки етилмагнійбромідом при зниженій температурі з утворенням сполуки 6.

Схема 2



ф) 4-заміщений оксазолідин-2-он, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, транс-N,N'-диметилциклогексан-1,2-діамін, карбонат калію, діоксан, нагрівання; г) $\text{HN}(\text{R}^2)\text{CH}(\text{R}^1)\text{CO}_2\text{H}$, CuI , K_3PO_4 , ДМСО, нагрівання; h) хлорид амонію, триетиламін, HATU (1-[біс(диметиламіно)метиле́н]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридин-3-оксиду гексафторфосфат).

Як показано на схемі 2, можна провести реакцію сполучення сполуки 6 з відповідним чином зміщеним оксазолідин-2-оном з використанням каталізатора на основі міді для одержання сполуки 7. Можна провести реакцію сполучення проміжної сполуки 7, що містить бром, з відповідним чином заміщеними амінокислотами з використанням каталізатора на основі міді, після чого здійснити HATU-опосередковану реакцію амідного сполучення з хлоридом амонію для одержання сполук 8.

ПРИКЛАДИ

Скорочення

ДМСО

диметилсульфоксид;

ESI

електрозпилювальна іонізація;

HPLC

рідинна хроматографія високого тиску;

LCMS

поєднання рідинної хроматографії та мас-спектрометрії;

хв

хвилини;

н.

нормальний;

ЯМР

ядерний магнітний резонанс;

R_T

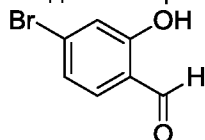
час утримання.

Метод А LCMS: експерименти проводили на квадрупольному мас-спектрометрі Micromass ZQ2000 від Waters, з'єднаному з системою для надефективної рідинної хроматографії (UPLC) Acquity від Waters з ультрафіолетовим (УФ) детектором на фотодіодній матриці (PDA). Спектрометр має електророзпилювальне джерело, що працює в режимі позитивних і негативних іонів. У цій системі використовується колонка Acquity BEH C18, 1,7 мкм, 100 x 2,1 мм, підтримувана при 40 °С, або колонка Acquity BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 100 x 2,1 мм, підтримувана при 40 °С, і швидкість потоку 0,4 мл/хвилина. В якості вихідної системи розчинників використовували суміш, що складається з 95 % води, що містить 0,1 % мурашиної кислоти, (розчинника А) і 5 % ацетонітрилу, що містить 0,1 % мурашиної кислоти, (розчинника В), протягом перших 0,4 хвилини, потім градієнт до 5 % розчинника А і 95 % розчинника В протягом наступних 5,6 хвилини. Цю суміш підтримували протягом 0,8 хвилини, після чого знову поверталися до суміші з 95 % розчинника А і 5 % розчинника В протягом наступних 0,2 хвилини. Загальний час хроматографування становив 8 хвилин.

Метод В LCMS: експерименти проводили на HPLC-системі Agilent 1100, з'єднаній з мас-спектрометром Agilent MSD, використовуючи ESI в якості джерела іонізації. Розділення методом LC проводили, використовуючи колонку XB-C18, 1,7 мкм, 50 x 2,1 мм, від Phenomenex, при швидкості потоку 0,4 мл/хвилина. Як розчинник А використовували воду з 0,1% мурашиної кислоти, а в якості розчинника В використовували ацетонітрil з 0,1 % мурашиної кислоти. Як градієнт використовували градієнт 2 → 98 % розчинника В протягом 7 хвилин з підтриманням рівня 97 % В протягом 1,5 хвилини, після врівноваження. Температура колонки для LC становить 40 °С. Дані по УФ поглинанню збирали при 220 нм і 254 нм і у всіх експериментах застосовували мас-спектрометричні сканування у всьому діапазоні мас.

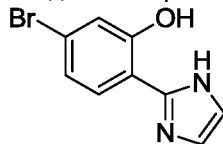
Приклад 101. (S)-2-((2-((S)-4-(Дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)пропанамід 101

Стадія 1. 4-Бром-2-гідроксибензальдегід

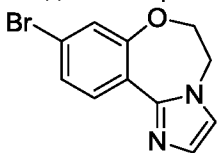


В 4-горлову круглодонну колбу ємністю 20 л, дегазовану та підтримувану в атмосфері інертного газу азоту, поміщали 3-бромфенол (1300 г; 7,51 моль), дихлормангній (1078 г; 11,3 моль), триетиламін (3034 г; 30,0 моль) і ацетонітрil (7,8 л). Суміш перемішували протягом 30 хвилин при 40 °С. До суміші додавали параформальдегід (676 г; 22,6 моль) при 80 °С. Одержаний розчин перемішували протягом 6 годин при 76 °С. Цю реакцію повторювали 5 разів. Об'єднані реакційні суміші гасили шляхом додавання 12 л водного розчину хлористого водню (4 н.). Значення рН розчину підводили до 5, використовуючи концентрований водний розчин хлористого водню (12 н.). Одержаний розчин екстрагували етилацетатом (1 x 20 л). Органічні екстракти випарювали в вакуумі. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (елюювали: 15 %-ним етилацетатом в петролейному ефірі), одержуючи неочищений продукт, який промивали 2,4 л суміші метил-трет-бутиловий ефір:гексан (1:4). Одержані тверді речовини збирали фільтруванням, одержуючи 7,0 кг (78 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді жовтої твердої речовини.

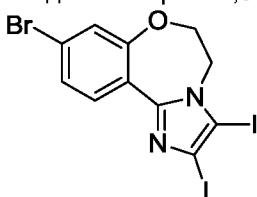
Стадія 2. 5-Бром-2-(1H-імідазол-2-іл)фенол



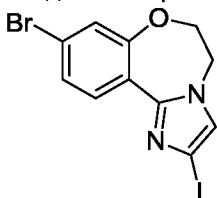
В 4-горлову круглодонну колбу ємністю 20 л поміщали розчин 4-бром-2-гідроксибензальдегіду (700 г; 3,50 моль) в метанолі (7,0 л) і оксальдегід (40 %-ний) (2540 г; 17,5 моль), потім по краплях додавали протягом 4 годин водний розчин аміаку (25-28 %-ний, 3500 г) з перемішуванням та підтриманням температури нижче 40 °С. Одержаний розчин перемішували протягом 15 годин при 30-35 °С. Цю реакцію повторювали 9 разів. Об'єднані 9 реакційних сумішей випарювали в вакуумі, підтримуючи температуру нижче 45 °С. Залишок розбавляли 100 л етилацетату з перемішуванням протягом 30 хвилин. Тверді речовини відфільтровували та одержаний розчин розбавляли водою. Водну фазу екстрагували 35 л етилацетату. Органічні екстракти випарювали під вакуумом та залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 5→75 % етилацетату в петролейному ефірі), одержуючи 2,4 кг (29 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді жовтої твердої речовини.

Стадія 3. 9-Бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін

У 4-горлову круглодонну колбу ємністю 20 л поміщали розчин 5-бром-2-(1*H*-імідазол-2-іл)фенолу (1,4 кг; 5,86 моль) в *N,N*-диметилформаміді (14 л) і карбонат цезію (7,2 кг; 22,1 моль). Суміш перемішували протягом 20 хвилин. До реакційної суміші додавали 1,2-диброметан (4,1 кг; 21,8 моль). Одержаний розчин перемішували протягом 4-12 годин при 85-90 °С, охолоджували до 15 °С і фільтрували. Осад на фільтрі промивали 3,0 л етилацетату. Фільтрат розбавляли 14 л етилацетату. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолем (4 x 14 л), сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували та випарювали в вакуумі, одержуючи 1,1 кг (71 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді світло-жовтої твердої речовини. LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 265$; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 8.32 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7.35-7.24 (m, 3H), 7.06 (s, 1H), 4.47-4.42 (m, 4H).

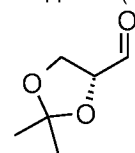
Стадія 4. 9-Бром-2,3-дйод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін

У 4-горлову круглодонну колбу ємністю 20 л поміщали 9-бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін (2,5 кг; 9,43 моль) і *N,N*-диметилформамід (12,5 л), потім при перемішуванні додавали *N*-йодсукцинімід (6,0 кг; 26,7 моль) у вигляді декількох порцій. Одержаний розчин перемішували протягом 12 годин при 60 °С, охолоджували до 15 °С в бані з сумішшю вода/лід, розбавляли, використовуючи 12,5 л суміші вода/лід, і фільтрували. Відфільтровані тверді речовини перекристалізовували з петролейного ефіру, одержуючи 4,0 кг (82 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді жовтої твердої речовини.

Стадія 5: 9-Бром-2-йод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін

У 4-горлову круглодонну колбу ємністю 20 л, дегазовану і підтримувану в атмосфері інертного газу азоту, поміщали 9-бром-2,3-дйод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін (800 г; 1,55 моль) і тетрагідрофуран (2,4 л), потім по краплях додавали етилмагнійбромід (1 н. розчин в ефірі; 1,7 л) з перемішуванням при -20 °С протягом 3,5 годин. Реакційну суміш перемішували протягом 3 годин, підтримуючи температуру при -15 °С з використанням бані з сумішшю лід/сіль. Одержану суміш гасили шляхом додавання 3,0 л насиченого водного розчину хлориду амонію і екстрагували етилацетатом (2 x 8,0 л). Об'єднані органічні екстракти промивали розсолем (2 x 10 л), сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Неочищений залишок розтирали з 8,0 л суміші етилацетат:петролейний ефір (1:5), фільтрували і промивали петролейним ефіром, одержуючи 501 г (83 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді коричневої твердої речовини. LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 391$; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 8.22 (d, $J = 8,7$ Гц, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.30-7.25 (m, 2H), 4.45-4.41 (m, 4H).

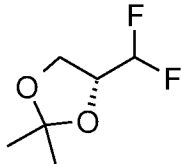
Стадія 6. (R)-2,2-Диметил-[1,3]діоксолан-4-карбальдегід



Періодат натрію (57,0 г; 270 ммоль) розчиняли в гарячій воді (115 мл) і додавали діоксид кремнію (200 г; 60 Å, 220-440 меш, розмір частинок 35-75 мкм). Суміш енергійно перемішували до одержання вільно текучого порошку. Його додавали до розчину 1,2:5,6-біс-О-(1-метилетиліден)-D-маніту (50 г; 190 ммоль) в дихлорметані (1,0 л) і реакційну суміш

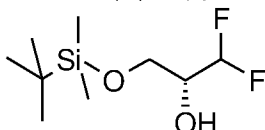
перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Одержану суміш фільтрували через набивку Na_2SO_4 і тверді речовини ретельно промивали дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти випарювали в вакуумі, одержуючи 37,2 г (75 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді безбарвного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9.73 (d, $J = 1,9$ Гц, 1H), 4.38 (ddd, $J = 7,4; 4,7; 1,9$ Гц, 1H), 4.18 (dd, $J = 8,8; 7,4$ Гц, 1H), 4.10 (dd, $J = 8,8; 4,7$ Гц, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.43 (s, 3H).

Стадія 7. (R)-4-Дифторметил-2,2-диметил-[1,3]діоксолан



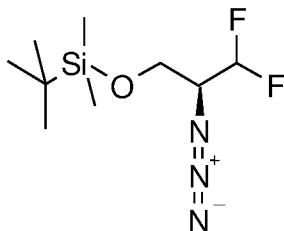
До розчину (R)-2,2-диметил-[1,3]діоксолан-4-карбальдегіду (7,08 г; 54 ммоль) в дихлорметані (50 мл), охолоджену в водяній бані, по краплях додавали трифторид діетиламіносірки (8,4 мл; 62,6 ммоль) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 годин. Одержану суміш по краплях додавали до швидко перемішуваного, охолодженого в льоді насиченого водного розчину бікарбонату натрію. Потім цю суміш екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі, одержуючи 6,58 г (79 %) неочищеної зазначеної в заголовку сполуки у вигляді оранжевого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.69 (td, $J = 55,8; 4,9$ Гц, 1H), 4.27-4.17 (m, 1H), 4.16-4.03 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.38 (s, 3H).

Стадія 8. (R)-3-(трет-Бутилдиметилсиланілокси)-1,1-дифторпропан-2-ол



HCl в діоксані (4 н.; 10,8 мл; 43,2 ммоль) додавали до розчину (R)-4-дифторметил-2,2-диметил[1,3]діоксолану (6,58 г; 43,2 ммоль) в метанолі (40 мл) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Одержану суміш випарювали в вакуумі і азеотропно відганяли з ацетонітрилом. Залишок розчиняли в N,N-диметилформаміді (10 мл) і додавали трет-бутилдиметилсилілхлорид (6,53 г; 43,2 ммоль), триетиламін (9,0 мл; 64,9 ммоль) і 4-(диметиламіно)піридин (в каталітичних кількостях). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Одержану суміш промивали водою і потім екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Одержаний неочищений залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→30 % етилацетату в циклогексані), одержуючи 3,43 г (35 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді жовтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.66 (td, $J = 56,4; 4,6$ Гц, 1H), 3.76-3.60 (m, 2H), 2.46 (d, $J = 6,4$ Гц, 1H), 0.81 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

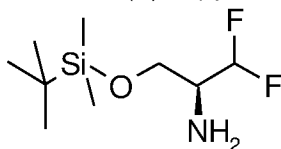
Стадія 9. ((S)-2-Азидо-3,3-дифторпропокси)-трет-бутилдиметилсилан



Трифторметансульфоновий ангідрид (2,9 мл; 17,4 ммоль) по краплях додавали до розчину (R)-3-(трет-бутилдиметилсиланілокси)-1,1-дифторпропан-2-олу (3,43 г; 15,1 ммоль) і піридину (2,0 мл; 24,2 ммоль) в дихлорметані (50 мл) при -20°C , реакційну суміш перемішували при -20°C протягом 20 хвилин і потім при 0°C протягом 1 години. Одержану суміш розбавляли 0,5 н. водним розчином HCl і екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти сушили над сульфатом магнію та випарювали в вакуумі. Неочищений залишок розчиняли в N,N-диметилформаміді (10 мл), додавали азид натрію (2,96 г; 45,5 ммоль) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Одержану суміш розбавляли водою і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі, одержуючи 4,50 г неочищеної

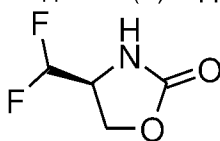
зазначеної в заголовку сполуки. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.74 (td, $J = 55,4$; 4,4 Гц, 1H), 3.81-3.71 (m, 2H), 3.58-3.47 (m, 1H), 0.81 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Стадія 10. (S)-1-(трет-Бутилдиметилсиланілоксиметил)-2,2-дифторетиламін



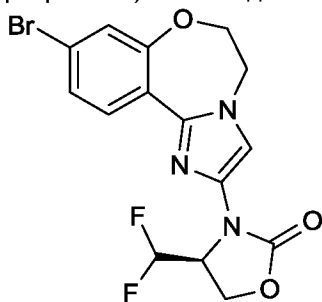
Гідроксид паладію на вугіллі (200 мг; 20 %-ний) додавали до розчину ((R)-2-азидо-3,3-дифторпропокси)-трет-бутилдиметилсилану (4,50 г; неочищеного, імовірно приблизно 15,1 ммоль) в етилацетаті (20 мл) і метанолі (2,0 мл) і реакційну суміш перемішували під тиском водню, що подається з балона, протягом 16 годин. Реакційну суміш фільтрували, додавали свіжу порцію гідроксиду паладію на вугіллі (400 мг; 20 %-ного) і реакційну суміш перемішували під тиском водню, що подається з балона, протягом 16 годин. Одержану суміш фільтрували і фільтрат випарювали в вакуумі, одержуючи 3,08 г (90 %) неочищеного зазначеного в заголовку продукту у вигляді безбарвного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.66 (td, $J = 57,0$; 4,7 Гц, 1H), 3.71-3.57 (m, 2H), 3.00-2.89 (m, 1H), 1.42 (br s, 2H), 0.82 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Стадія 11. (S)-4-Диформетилноксазолідин-2-он



Розчин HCl в діоксані (4 н.; 5,0 мл; 20 ммоль) додавали до розчину (R)-1-(трет-бутилдиметилсиланілоксиметил)-2,2-дифторетиламіну (Org. Lett., Vol. 9, № 1, 2007, 41-44) (2,30 г; 10,3 ммоль) в метанолі (5,0 мл) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Суміш випарювали в вакуумі і одержане масло розтирали з діетиловим ефіром, одержуючи тверду речовину, яку сушили в вакуумі. Цю тверду речовину розчиняли в суміші толуолу (20 мл) і KOH (2,50 г; 44,6 ммоль в 20 мл води) при 0°C . По краплях додавали фосген (16,3 мл; 20 %-ний розчин в толуолі), охолоджуючу баню видаляли і реакційну суміш перемішували протягом 1 години. Суміш випарювали в вакуумі, одержаний залишок екстрагували гарячим промисловим денатурованим спиртом і тверду речовину збирали фільтруванням. Фільтрат випарювали в вакуумі і одержаний залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: $0 \rightarrow 100$ % етилацетату в циклогексані), одержуючи 830 мг (68 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді білуватої твердої речовини. $[\alpha]_D^{25} = +10,1$ ($c = 2,37$; CHCl_3). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.96 (br s, 1H), 5.78 (td, $J = 55,3$; 4,8 Гц, 1H), 4.54 (t, $J = 9,2$ Гц, 1H), 4.42 (dd, $J = 9,6$; 4,4 Гц, 1H), 4.17-4.06 (m, 1H).

Стадія 12. (S)-3-(9-Бром-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(диформетил)ноксазолідин-2-он



Суміш 9-бром-2-йод-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепіну (250 мг; 0,64 ммоль), (S)-4-диформетилноксазолідин-2-ону (88 мг; 0,64 ммоль), транс-N,N'-диметил-1,2-циклогександіаміну (36 мг; 0,26 ммоль), йодиду одновалентної міді (24 мг; 0,13 ммоль) і карбонату калію (177 мг; 1,28 ммоль) в діоксані (3,0 мл) продували аргонном при обробці ультразвуком. Реакційну суміш нагрівали при 100°C протягом 5 г і потім залишали охолоджуватися до кімнатної температури. Одержану суміш розбавляли 15 %-ним водним розчином аміаку і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Одержаний залишок розтирали з метанолом і потім очищали препаративною HPLC [C18, 60 %-ний ацетонітрil (з 0,1 % мурашиної кислоти) в воді (з 0,1 % мурашиної кислоти), тривалість хроматографування 20 хвилин], одержуючи 20 мг (8 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді

білої твердої речовини. LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 400/402$. ^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8.19 (d, J = 9,2 Гц, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.24-7.19 (m, 2H), 6.65 (ddd, J = 57,8; 54,5; 1,0 Гц, 1H), 4.87 (ddd, J = 24,0; 9,2; 4,0 Гц, 1H), 4.73 (dd, J = 9,5; 4,2 Гц, 1H), 4.53 (t, J = 9,2 Гц, 1H), 4.48-4.43 (m, 2H), 4.38-4.33 (m, 2H).

5 Стадія 13. (S)-2-((2-((S)-4-(Дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)пропанамід

(S)-3-(9-Бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-

(дифторметил)оксазолідин-2-он (600 мг; 1,50 ммоль), L-аланін (267 мг; 3,00 ммоль), йодид

10 одновалентної міді (57 мг; 0,30 ммоль) і фосфат калію триосновний (637 мг; 3,00 ммоль) суспендували в диметилсульфоксиді (6,0 мл). Реакційну суміш нагрівали при 100 °С протягом 2 годин. Після охолодження до кімнатної температури додавали диметилсульфоксид (4,0 мл),

хлорид амонію (480 мг; 9,00 ммоль) і триетиламін (3,1 мл; 22,5 ммоль). До одержаної

15 суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години і потім фільтрували через Celite®, промиваючи етилацетатом. Органічні екстракти промивали насиченим водним

розчином бікарбонату натрію і водну фазу екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні

20 екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом натрію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Неочищений залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі

(градієнт розчинників: 0→5 % метанолу в дихлорметані) і потім шляхом хіральної надкритичної

рідинної хроматографії, одержуючи 294 мг (46 %) сполуки 101 у вигляді білуватої твердої

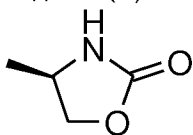
25 речовини. LCMS (ESI): R_T (мін) = 2,89, $[M+H]^+ = 408$, метод А; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 8.00 (d, J = 8,7 Гц, 1H), 7.38 (br s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.00 (br s, 1H), 6.71 (t, J = 55,9 Гц, 1H), 6.41 (dd, J = 8,8; 2,3 Гц, 1H), 6.16 (d, J = 7,2 Гц, 1H), 6.09 (d, J = 1,9 Гц, 1H), 5.02-4.89 (m, 1H), 4.63-4.52 (m,

2H), 4.39-4.30 (m, 4H), 3.76 (квintет, J = 7,0 Гц, 1H), 1.30 (d, J = 7,1 Гц, 3H).

Приклад 102. (S)-2-Циклобутил-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-

дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід 102

Стадія 1. (R)-4-Метилксазолідин-2-он



30 До суміші D-аланінолу (8,65 г; 0,12 ммоль) в толуолі і водному розчині KOH (124 мл; 12,5 %-

ному водн.; 0,28 ммоль) при 0 °С додавали фосген (72,7 мл; 20 %-ний розчин в толуолі; 0,14

ммоль) з такою видкістю, щоб внутрішня температура залишалася нижче 5 °С. Реакційну суміш

35 перемішували при 0 °С протягом ще 40 хвилин, потім випарювали насухо. Неочищений залишок

екстрагували промисловим денатурованим спиртом, суспензію фільтрували і фільтрат

випарювали в вакуумі. Одержаний залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на

силікагелі (градієнт розчинників: 40→100 % етилацетату в циклогексані), одержуючи 10,4 г (90

%) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді білої твердої речовини. ^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ

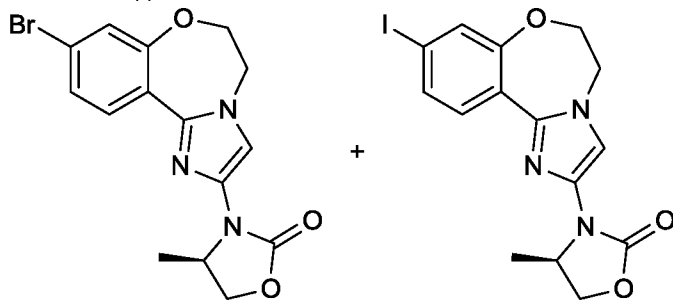
6.00 (br s, 1H), 4.50 (t, J = 6,5 Гц, 1H), 4.07-3.97 (m, 1H), 3.95 (dd, J = 7,8; 6,2 Гц, 1H), 1.30 (d, J =

6,1 Гц, 3H).

40 Стадія 2. (R)-3-(9-Бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-

метилксазолідин-2-он і (R)-3-(9-йод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-

метилксазолідин-2-он



45 Суміш 9-бром-2-йод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепіну (30,0 г; 76,7 ммоль), (R)-

4-метилксазолідин-2-ону (7,70 г; 76,7 ммоль), йодиду одновалентної міді (1,61 г; 8,40 ммоль),

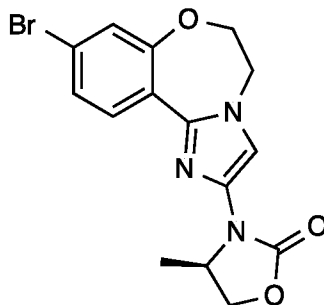
транс-N,N'-диметил-1,2-циклогександіаміну (2,7 мл; 16,9 ммоль) і карбонату калію (14,9 г; 107

ммоль) суспендували в 1,4-діоксані (200 мл) і реакційну суміш продували аргоном при обробці

ультразвуком. Одержану суміш нагрівали при 100 °С протягом 16 г. Реакційну суміш розбавляли

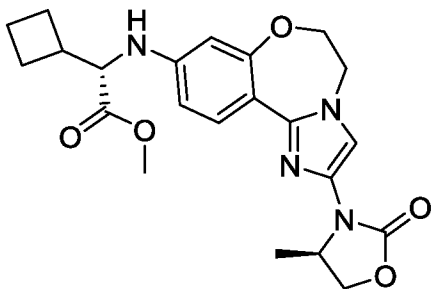
водним розчином аміаку (приблизно 16 %-ним) і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Одержаний залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→100 % етилацетату в циклогексані), одержуючи 13,4 г (приблизно 42 %) зазначеної в заголовку сполуки (суміш продуктів 9-Br:9-I в співвідношенні приблизно 2:1). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.28 (d, J = 7,6 Гц, 0.33H), 8.11 (d, J = 6,9 Гц, 0.66H), 7.42-7.38 (m, 1H), 7.28-7.24 (m, 1.33H), 7.23-7.18 (m, 0.66H), 4.77-4.68 (m, 1H), 4.58 (t, J = 8,3 Гц, 1H), 4.49-4.39 (m, 2H), 4.37-4.30 (m, 2H), 4.08 (dd, J = 8,4; 4,5 Гц, 1H), 1.57-1.50 (m, 3H).

Стадія 3. (R)-3-(9-Бром-5,6-дигідроімідазо[1,2-d][1,4]бензоксазепін-2-іл)-4-метил-оксазолідин-2-он



80 мг суміші (R)-3-(9-бром-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-2-іл)-4-метилоксазолідин-2-ону і (R)-3-(9-йод-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-2-іл)-4-метилоксазолідин-2-ону розділяли шляхом хіральної SFC, одержуючи 27,6 мг зазначеної в заголовку сполуки. LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 364,0/366,0/367,2; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8.22 (d, J = 8,7 Гц, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.31 (dd, J = 8,7; 2,1 Гц, 1H), 7.25 (d, J = 2,0 Гц, 1H), 4.65-4.54 (m, 2H), 4.49-4.43 (m, 4H), 4.09-4.06 (m, 1H), 1.42 (d, J = 6,0 Гц).

Стадія 4. Метил-(S)-2-циклобутил-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетат



Суміш (4R)-3-(9-бром-5,6-дигідроімідазо[1,2-d][1,4]бензоксазепін-2-іл)-4-метил-оксазолідин-2-ону (0,2746 ммоль; 100 мг), йодиду одновалентної міді (0,084 ммоль; 16 мг), (2S)-2-аміно-2-циклобутил-оцтової кислоти (1,10 ммоль; 142 мг) і фосфату калію триосновного (1,37 ммоль; 297 мг) в диметилсульфоксиді (3 мл) нагрівали в умовах опромінення мікрохвилями при 120 °C протягом 2 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, додавали йодметан (1,4 ммоль; 0,086 мл) і реакційну суміш екстрагували дихлорметаном і водою. Об'єднані органічні екстракти об'єднували, промивали розсолон і сушили з викоистанням сульфату натрію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Неочищений продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (24 г діоксиду кремнію; градієнт розчинників: 5-40% суміші 3:1 ізопропілацетат:метанол в дихлорметані), одержуючи 100 мг (85 %) зазначеної в заголовку сполуки.

Стадія 5. (S)-2-Циклобутил-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід

До розчину метил-(2S)-2-циклобутил-2-[[2-[(4R)-4-метил-2-оксо-оксазолідин-3-іл]-5,6-дигідроімідазо[1,2-d][1,4]бензоксазепін-9-іл]аміно]ацетату (0,234 ммоль; 100 мг) в тетрагідрофурані (5 мл) додавали воду (0,45 мл) і гідроксиду літію моногідрат (0,357 ммоль; 15 мг). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 6 годин. Реакційну суміш випарювали в вакуумі. До розчину одержаного залишку в N,N-диметилформаміді (3 мл) додавали 1-[біс(диметиламіно)метиле]н-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридин-3-оксиду гексафторфосфат (0,353 ммоль; 137 мг), хлорид амонію (0,71 ммоль; 38 мг) і N,N-діізопропілетиламін (0,705 ммоль; 0,123 мл) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Реакційну суміш випарювали в вакуумі і одержаний залишок обробляли водою, потім екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти промивали

розсоллом, сушили над сульфатом магнію та випарювали в вакуумі. Неочищений продукт очищали шляхом обернено-фазової HPLC, потім SFC і ліофілізували, одержуючи 15,0 мг (15 %) сполуки 102. LCMS (ESI): R_T (мін) = 3,03, $[M+H]^+$ = 412,2, метод D; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 7.96 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.39-7.36 (brs, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.00-6.97 (brs, 1H), 6.44 (dd, J = 8,9; 2,3 Гц, 1H), 6.14 (d, J = 2,3 Гц, 1H), 5.96 (d, J = 7,7 Гц, 1H), 4.62-4.49 (m, 2H), 4.38-4.28 (m, 4H), 4.06-4.03 (m, 1H), 3.70-3.61 (m, 1H), 2.06-1.75 (m, 6H), 1.42-1.34 (m, 3H).

Приклад 103. (S)-2-Циклопропіл-2-((2-((S)-4-(дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід 103

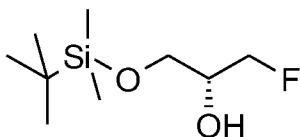
Суміш (S)-3-(9-бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(дифторметил)оксазолідин-2-ону із стадії 12 прикладу 101 (400 мг; 1,00 ммоль), L-циклопропілгліцину (230 мг; 2,00 ммоль), йодиду одновалентної міді (38 мг; 0,20 ммоль) і фосфату калію триосновного (424 мг; 2,00 ммоль) в диметилсульфоксиді (2,0 мл) продували аргонном при обробці ультразвуком. Суміш нагрівали при 100 °C протягом 5 годин, потім охолоджували до температури навколишнього середовища. Одержану суміш розбавляли диметилсульфоксидом (5,0 мл) і додавали хлорид амонію (320 мг; 6,00 ммоль) і триетиламін (1,4 мл; 10,0 ммоль). Потім до перемішуваної суспензії порціями додавали 1-[біс(диметиламіно)метиле́н]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]піридиній-3-оксиду гексафторфосфат (2,28 г; 6,0 ммоль) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Одержану суміш розбавляли 15 %-ним водним розчином аміаку і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсоллом, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Неочищений залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→7 % метанолу в етилацетаті). Залишок розчиняли в мінімальній кількості ацетонітрилу. Потім додавали воду для осадження твердої речовини, яку збирали фільтруванням і сушили в вакуумі, одержуючи 324 мг (75 %) сполуки 103 у вигляді білуватої твердої речовини. LCMS (ESI): R_T (мін) = 3,21, $[M+H]^+$ = 434, метод A; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 7.98 (d, J = 8,6 Гц, 1H), 7.40 (br s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.03 (br s, 1H), 6.71 (t, J = 56,0 Гц, 1H), 6.42 (dd, J = 8,9; 2,4 Гц, 1H), 6.24 (d, J = 7,2 Гц, 1H), 6.09 (d, J = 2,4 Гц, 1H), 5.01-4.89 (m, 1H), 4.63-4.51 (m, 2H), 4.38-4.29 (m, 4H), 3.15 (t, J = 7,7 Гц, 1H), 1.16-1.05 (m, 1H), 0.56-0.44 (m, 3H), 0.33-0.25 (m, 1H).

Приклад 104. (S)-2-Циклопропіл-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід 104

Суміш (R)-3-(9-бром-5,6-дигідроімідазо[1,2-*d*][1,4]бензоксазепін-2-іл)-4-метил-оксазолідин-2-ону (приклад 102, стадія 3) (1,098 ммоль; 400 мг), йодиду одновалентної міді (0,330 ммоль; 62,8 мг), (2S)-2-аміно-2-циклопропіл-оцтової кислоти (3,295 ммоль; 379,3 мг) і фосфату калію триосновного (4,393 ммоль; 951,5 мг) в диметилсульфоксиді (35 ммоль; 2,5 мл) нагрівали при 110 °C протягом 2 годин в умовах опромінення мікрохвилями. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури. До реакційної суміші додавали 1-[біс(диметиламіно)метиле́н]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]піридиній-3-оксиду гексафторфосфат (12,08 ммоль; 4260 мг), хлорид амонію (12,08 ммоль; 646 мг) і триетиламін (1,53 мл; 11,0 ммоль). Через 20 хвилин витримання при кімнатній температурі реакційну суміш обробляли водою, потім екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти промивали розсоллом, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Неочищений продукт очищали шляхом обернено-фазової HPLC і ліофілізували, одержуючи 110 мг (25 % за 2 стадії) сполуки 104. LCMS (ESI): R_T (мін) = 2,588, $[M+H]^+$ = 398,2, метод B; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 7.96 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.39 (d, J = 2,2 Гц, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.02 (d, J = 2,3 Гц, 1H), 6.42 (dd, J = 8,9; 2,4 Гц, 1H), 6.20 (d, J = 7,1 Гц, 1H), 6.09 (d, J = 2,4 Гц, 1H), 4.61-4.49 (m, 2H), 4.40-4.27 (m, 4H), 4.10-3.99 (m, 1H), 3.22-3.09 (m, 1H), 1.42-1.36 (m, 3H), 1.16-1.04 (m, 1H), 0.56-0.42 (m, 3H), 0.32-0.27 (m, 1H).

Приклад 105. (S)-2-Циклопропіл-2-((2-((S)-4-(фторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід 105

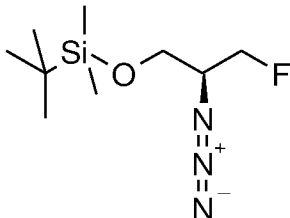
Стадія 1. (R)-1-(трет-Бутилдиметилсиланілокси)-3-фторпропан-2-ол



трет-Бутилдиметилсилілхлорид (1,60 г; 10,63 ммоль) додавали до розчину (R)-3-фторпропан-1,2-діолу (1,00 г; 10,6 ммоль), триетиламіну (1,93 мл; 13,8 ммоль) і каталітичної кількості 4-(диметиламіно)піридину в дихлорметані при 0 °C, реакційну суміш залишали нагріватися до кімнатної температури і перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин. Реакційну суміш розбавляли водою і екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні

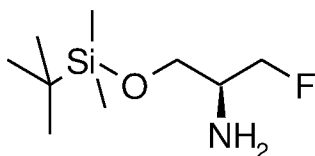
фракції промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Одержаний неочищений залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→40 % етилацетату в циклогексані), одержуючи 1,80 г (81 %) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді безбарвного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4.45-4.36 (m, 1H), 4.34-4.25 (m, 1H), 3.87-3.73 (m, 1H), 3.66-3.56 (m, 2H), 2.30 (d, J = 6,0 Гц, 1H), 0.82 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Стадія 2. (S)-2-Азидо-3-фторпропокси)-трет-бутилдиметилсилан



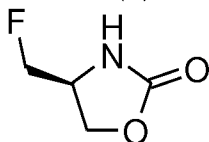
Трифторметансульфоновий ангідрид (1,67 мл; 9,93 ммоль) по краплях додавали до розчину (R)-1-(трет-бутилдиметилсиланілокси)-3-фторпропан-2-олу (1,80 г; 8,60 ммоль) і піридину (1,2 мл; 13,8 ммоль) в дихлорметані при -20 °C і реакційну суміш перемішували при -20 °C протягом 20 хвилин, потім при 0 °C протягом 30 хвилин. Реакційну суміш розбавляли 0,5 н. водним розчином HCl і екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Залишок розчиняли в N,N-диметилформаміді (5,0 мл) і додавали азид натрію (1,68 г; 25,9 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Одержану суміш розбавляли водою і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі, одержуючи неочищену зазначену в заголовку сполуку, яку переносили на наступну стадію без очищення. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4.58-4.26 (m, 2H), 3.75-3.63 (m, 2H), 3.62-3.46 (m, 1H), 0.80 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Стадія 3. (S)-1-(трет-Бутилдиметилсиланілоксиметил)-2-фторетиламін



Гідроксид паладію (400 мг; 20 %-ний на вугіллі) додавали до розчину ((S)-2-азидо-3-фторпропокси)-трет-бутилдиметилсилану (неочищеного; імовірно 8,60 ммоль) в етилацетаті (15 мл) і метанолі (5,0 мл) і реакційну суміш перемішували під тиском водню, що подається з балона, протягом 16 годин. Одержану суміш фільтрували, додавали свіжу порцію гідроксиду паладію (400 мг; 20 %-ного на вугіллі) і реакційну суміш перемішували під тиском водню, що подається з балона, протягом ще 16 годин. Одержану суміш фільтрували і фільтрат випарювали в вакуумі, одержуючи зазначену в заголовку сполуку у вигляді суміші продукт:вихідна речовина в співвідношенні приблизно 2:1, яку переносили на наступну стадію без очищення.

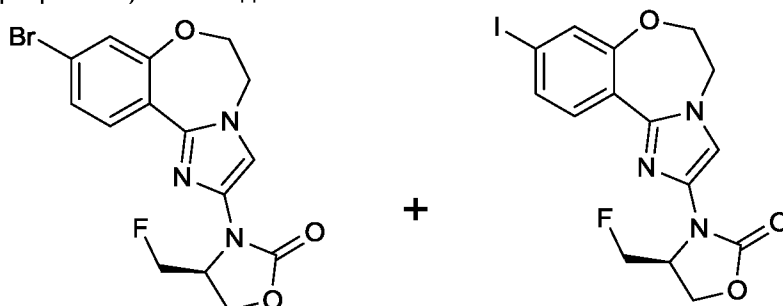
Стадія 4. (S)-4-Фторметилоксазолідин-2-он



Розчин HCl в діоксані (4 н.; 2,0 мл; 8,00 ммоль) додавали до розчину (S)-1-(трет-бутилдиметилсиланілоксиметил)-2-фторетиламіну (неочищеного; імовірно 8,60 ммоль) в метанолі (3,0 мл) і одержану суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Реакційну суміш випарювали в вакуумі. Одержаний залишок розчиняли в суміші толуолу (20 мл) і КОН (2,89 г; 51,6 ммоль; 12,5 %-ного водн. розчину) при 0 °C. До цієї суміші по краплях додавали фосген (13,6 мл; 20 %-ний розчин в толуолі), охолоджуючу баню видаляли і одержану суміш перемішували протягом 1 години. Реакційну суміш випарювали в вакуумі і одержаний залишок екстрагували гарячим промисловим денатурованим спиртом. Фільтрат випарювали в вакуумі і одержаний залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 50→100 % етилацетату в циклогексані), одержуючи 450 мг (44 %; за 3

стадії) зазначеної в заголовку сполуки у вигляді білуватої твердої речовини. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.69 (br s, 1H), 4.59-4.42 (m, 2H), 4.42-4.32 (m, 1H), 4.25-4.08 (m, 2H).

Стадія 5. (S)-3-(9-Бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(фторметил)оксазолідин-2-он і (S)-3-(9-йод-5,6-дигідро-бензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(фторметил)оксазолідин-2-он



Суміш 9-бром-2-йод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепіну (722 мг; 1,85 ммоль), (S)-4-фторметилоксазолідин-2-ону (220 мг; 1,85 ммоль), 3,4,7,8-тетраметил-1,10-фенантроліну (131 мг; 0,55 ммоль), $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (74 мг; 0,37 ммоль), карбонату калію (510 мг; 3,70 ммоль) і діоксану (6,0 мл) герметично закривали в пробірці і суміш продували аргонном при обробці ультразвуком. Реакційну суміш нагрівали при 100 °C протягом 72 годин. Одержану реакційну суміш розбавляли 15 %-ним водним розчином аміаку і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Неочищений залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→100 % етилацетату в циклогексані), одержуючи 390 мг (53 %) зазначених в заголовку сполук (суміші продуктів 9-Br і 9-I в співвідношенні приблизно 2:1). LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 382/384/430$; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8.22 (d, J = 9,3 Гц, 0.7H), 8.05 (d, J = 8,8 Гц, 0.3H), 7.43-7.37 (m, 0.6H), 7.29 (s, 1.2H), 7.23-7.18 (m, 1.2H), 5.03-4.66 (m, 3H), 4.60 (t, J = 8,5 Гц, 1H), 4.54 (dd, J = 8,6; 4,3 Гц, 1H), 4.47-4.43 (m, 2H), 4.37-4.33 (m, 2H).

Стадія 6. (S)-2-Циклопропіл-2-((2-((S)-4-(фторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід

Суміш (S)-3-(9-бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(фторметил)оксазолідин-2-ону і (S)-3-(9-йод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(фторметил)оксазолідин-2-ону (195 мг; суміш Br:I у співвідношенні приблизно 2:1; приблизно 0,49 ммоль), L-циклопропілгліцину (104 мг; 0,90 ммоль), йодиду одновалентної міді (17 мг; 0,09 ммоль) і фосфату калію триосновного (190 мг; 0,90 ммоль) в диметилсульфоксиді (1,5 мл) продували аргонном при обробці ультразвуком. Реакційну суміш нагрівали при 100 °C протягом 16 годин, потім охолоджували до кімнатної температури. Одержану суміш розбавляли диметилсульфоксидом (1,0 мл) і додавали хлорид амонію (144 мг; 2,70 ммоль) і триетиламін (950 мкл, 6,75 ммоль). Потім до цієї суміші порціями додавали 1-[біс(диметиламіно)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]піридиній-3-оксиду гексафторфосфат (1,54 г; 4,05 ммоль) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Одержану суміш розбавляли насиченим водним розчином бікарбонату натрію і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Одержаний неочищений залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→5 % метанолу в дихлорметані) і потім додатково очищали флеш-хроматографією на силікагелі (градієнт розчинників: 0→100 % метилацетату в циклогексані), одержуючи 90 мг (48 %) сполуки 105 у вигляді білуватої твердої речовини. LCMS (ESI): R_T (мін) = 2,76 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 416$, метод А; ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.94 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.40 (br s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.03 (br s, 1H), 6.41 (dd, J = 8,8; 2,3 Гц, 1H), 6.22 (d, J = 7,1 Гц, 1H), 6.09 (d, J = 2,2 Гц, 1H), 4.99 (ddd, J = 48,3; 9,8; 2,5 Гц, 1H), 4.81-4.56 (m, 3H), 4.40 (dd, J = 8,6; 3,9 Гц, 1H), 4.37-4.29 (m, 4H), 3.15 (t, J = 7,6 Гц, 1H), 1.16-1.05 (m, 1H), 0.54-0.43 (m, 3H), 0.33-0.25 (m, 1H).

Приклад 106. (S)-2-((2-((S)-4-(Фторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)пропанамід 106

Суміш (S)-3-(9-бром-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(фторметил)оксазолідин-2-ону і (S)-3-(9-йод-5,6-дигідробензо[*f*]імідазо[1,2-*d*][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(фторметил)оксазолідин-2-ону (приклад 105, стадія 5) (195 мг; суміш 9-Br:9-I у співвідношенні приблизно 2:1; приблизно 0,49 ммоль), L-аланіну (87 мг; 0,98 ммоль), йодиду одновалентної міді (17 мг; 0,09 ммоль) і фосфату калію триосновного (208 мг; 0,98 ммоль) в диметилсульфоксиді (3,0 мл) продували аргонном при обробці ультразвуком. Реакційну суміш нагрівали при 100 °C

протягом 4 годин, потім охолоджували до кімнатної температури. Одержану суміш розбавляли диметилсульфоксидом (3,0 мл) і додавали хлорид амонію (157 мг; 2,94 ммоль) і триетиламін (683 мкл; 4,8 ммоль). Потім до цієї суміші порціями додавали 1-[біс(диметиламіно)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридиний-3-оксиду гексафторфосфат (1,10 г; 2,94 ммоль) і реакційну суміш

перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Одержану суміш розбавляли насиченим водним розчином бікарбонату натрію і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти промивали розсолон, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Одержаний залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→5 % метанолу в дихлорметані) і потім додатково очищали хіральною надкритичною рідинною хроматографією, одержуючи 36 мг (19 %) сполуки 106 у вигляді білуватої твердої речовини. LCMS (ESI): R_T (мін) = 2,43 $[M+H]^+$ = 390, метод А; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 7.96 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.37 (br s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.00 (br s, 1H), 6.39 (dd, J = 8,6; 1,6 Гц, 1H), 6.15 (d, J = 7,0 Гц, 1H), 6.09 (d, J = 1,6 Гц, 1H), 5.08-4.55 (m, 5H), 4.42-4.28 (m, 4H), 3.76 (квінтет, J = 7,2 Гц, 1H), 1.30 (d, J = 7,2 Гц, 3H).

Приклад 107. (S)-2-((2-((S)-4-(Дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)бутанамід 107

Суміш (S)-3-(9-бром-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-2-іл)-4-(дифторметил)оксазолідин-2-ону (приклад 101, стадія 12) (240 мг; 0,60 ммоль), (S)-2-аміномасляної кислоти (124 мг; 1,19 ммоль), йодиду одновалентної міді (22,8 мг; 0,119 ммоль), фосфату калію триосновного (255 мг; 1,19 ммоль) і диметилсульфоксиду (6,0 мл) перемішували в атмосфері аргону при 100 °C протягом 6 годин. Одержану суміш залишали охолоджуватися до кімнатної температури і потім додавали хлорид амонію (188 мг; 3,52 ммоль) і триетиламін (1,2 мл; 8,80 ммоль). До перемішуваної суспензії порціями додавали 1-[біс(диметиламіно)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридиний-3-оксиду гексафторфосфат (2,01 г; 5,28 ммоль) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Одержану суміш розбавляли етилацетатом, промивали насиченим розчином хлориду амонію, сушили над сульфатом магнію, фільтрували та випарювали в вакуумі. Неочищений продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт розчинників: 0→10 % метанолу в етилацетаті), додатково очищали шляхом обернено-фазової HPLC, потім хіральної надкритичної рідинної хроматографії, одержуючи 73,6 мг (30%) сполуки 107 у вигляді білої твердої речовини. LCMS (ESI): R_T (мін) = 3,13, $[M+H]^+$ = 422, метод А; ^1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 7.99 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.71 (t, J = 56,0 Гц, 1H), 6.44 (dd, J = 8,8; 2,2 Гц, 1H), 6.13 (d, J = 2,2 Гц, 1H), 6.09 (d, J = 7,6 Гц, 1H), 5.02-4.89 (m, 1H), 4.62-4.53 (m, 2H), 4.41-4.27 (m, 4H), 3.65-3.60 (m, 1H), 1.72-1.59 (m, 2H), 0.94 (t, J = 7,3 Гц, 3H).

Приклад 901. Аналіз зв'язування p110 α (альфа) PI3K

Аналізи зв'язування з PI3K призначені для визначення біохімічної ефективності низькомолекулярних інгібіторів PI3K. Реакцію за участю ліпідної кінази PI3K проводять в присутності ліпідного субстрату PIP2: 3PS (суміш 1:3 PIP2 і фосфатидилсерину) (Promega, № V1792) і АТФ (аденозинтрифосфат). Після завершення кіназної реакції ступінь перетворення АТФ в АДФ (аденозиндифосфат) в результаті фосфорилування ліпідного субстрату детектують з використанням набору для аналізу ADP-Glo™ від Promega (Promega, № V1792). Реакції проводять, використовуючи для кожної ізоформи PI3K наступні далі умови, які наведені в Таблиці 5.

Таблиця 5

Кіназа	Джерело	Кінцева концентрація кінази	АТФ (мкМ)	PIP2:3PS (мкМ)	Час реакції (хв.)
PIP3K-альфа	Millipore, № 14-602-K	0,2 nM	40	50	120
PIP3K-бета	Promega, № V1751	0,6 nM	40	50	120
PIP3K-дельта	Millipore, № 14-604-K	0,25 nM	40	50	120
PIP3K-гамма	Millipore, № 14-558-K	0,4 nM	25	50	120

Коли тривалість реакції досягає 120 хвилин, кіназну реакцію зупиняють. Весь АТФ, що залишився після проходження реакції, видаляють, при цьому залишається тільки АДФ. Потім додають реагент для детекції кінази, щоб перетворити АДФ в АТФ, який використовують в сполученій люциферин/люциферазній реакції. Вимірюють вихід за люмінесценцією і співвідносять з кіназною активністю.

Всі реакції проводять при кімнатній температурі. Для кожної ізоформи PI3K додають по 3 мкл суміші розчину фермент/ліпідний субстрат (1:1) в 384-лунковий використовуваний в аналізі білий планшет (Perkin Elmer, № 6007299), що містить 50 нл розчину тестованої сполуки або ДМСО тільки для необроблюваних контролів. Реакцію ініціюють шляхом додавання 2 мкл суміші АТФ/MgCl₂. Буфер для кіназної реакції містить 50 mM HEPES (N-2-гідроксietил-піперазин-N-2-етансульфонова кислота), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,01 % BSA (бичачий сироватковий альбумін), 1 % ДМСО, а фермент і субстрат використовують в концентраціях, вказаних в наведеній вище таблиці. Реакцію зупиняють шляхом додавання 10 мкл реагенту ADP-Glo. Планшети зчитують з використанням системи Envision від Perkin Elmer, застосовуючи режим для визначення інтенсивності люмінесценції. Для кожної тестової сполуки одержують криву залежності відповідей від дози по 10 точкам. Величини K_i для кожної сполуки визначають, використовуючи рівняння Моррісона.

Аналізи зв'язування: початкові експерименти по поляризації проводили на Analyst HT 96-384 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Зразки для вимірювання афінності методом поляризації флуоресценції готували, додаючи p110-альфа PI3K (Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, VA) в серійних розведеннях 1:3, починаючи з кінцевої концентрації 20 мкг/мл, в буфері для вимірювання поляризації (10 mM Трис, pH 7,5; 50 mM NaCl; 4 mM MgCl₂; 0,05% CHAPS (3-[(3-холоамідопропіл)-диметиламоніо]-1-пропан-сульфонат) і 1 mM DTT (дитіотреїт)), до PIP2 (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) в кінцевій концентрації 10 mM. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі реакції зупиняли, додаючи GRP-1 (основний рецептор фосфоінозитидів) і зонд PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT) в кінцевих концентраціях 100 нМ і 5 нМ, відповідно. Вимірювання проводили, використовуючи стандартні фільтри з обмеженою пропускну здатністю для флуорофору родаміну ($\lambda_{\text{збуд.}}$ = 530 нм; $\lambda_{\text{вик.}}$ = 590 нм) в 384-лункових чорних планшетах на малі об'єми Proxiplates® (PerkinElmer, Wellesley, MA). Будували графік залежності величин поляризації флуоресценції від концентрації білка. Значення EC₅₀ отримували шляхом апроксимації даних до чотирипараметричного рівняння з використанням програмного забезпечення KaleidaGraph® (програмне забезпечення для аналізу синергетичної дії (synergy software), Reading, PA). В цьому експерименті також встановлюють концентрацію білка, яка підходить для використання в наступних експериментах по конкуренції з інгібіторами.

Величини IC₅₀ для інгібіторів визначали, додаючи p110-альфа PI3K (кінцева концентрація 0,04 мкг/мл) разом з PIP2 (кінцева концентрація 10 мМ) в лунки, що містять серійні розведення (1:3) антагоністів в розчин АТФ в кінцевій концентрації 25 мМ (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) в буфері для вимірювання поляризації. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі реакції зупиняли, додаючи GRP-1 і зонд PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT) в кінцевій концентрації 100 нМ і 5 нМ, відповідно. Вимірювання проводили, використовуючи стандартні фільтри з обмеженою пропускну здатністю для флуорофору родаміну ($\lambda_{\text{збуд.}}$ = 530 нм; $\lambda_{\text{вик.}}$ = 590 нм) в 384-лункових чорних планшетах на малі об'єми Proxiplates® (PerkinElmer, Wellesley, MA). Будували графік залежності величин поляризації флуоресценції від концентрації антагоністів і шляхом апроксимації даних до чотирипараметричного рівняння з використанням програмного забезпечення Assay Explorer (MDL, San Ramon, CA) отримували значення IC₅₀.

Альтернативно, інгібування PI3K визначали в радіометричному аналізі з використанням очищеного рекомбінантного ферменту і АТФ в концентрації 1 мкМ (мікромольній). Виконували серійні розведення сполуки в 100 %-му ДМСО. Реакційну суміш з кіназою інкубували протягом 1 г при кімнатній температурі і реакцію зупиняли, додаючи PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин). Потім визначали значення IC₅₀, використовуючи апроксимацію залежності доза-відповідь до сигмоїдальної кривої (з варіабельним нахилом).

Приклад 902. Селективне інгібування мутантних форм PI3K α (альфа)

Здатність сполуки даного винаходу діяти переважно проти клітин, що містять мутантні форми PI3K α (альфа), визначали за допомогою вимірювання інгібування PI3K-шляху в ізогенних клітинних лініях SW48: з PI3K α дикого типу (батьківська лінія), з мутацією E545K в спіральному домені і з мутацією H1047R в кіназному домені. Наведені далі аналізи призначені для визначення ефективності низькомолекулярних інгібіторів PI3K α в клітинах та їх селективності відносно мутантних форм. В даному аналізі використовують ізогенні клітинні лінії, які експресують PI3K α дикого типу (WT), PI3K α з мутацією E545K/+ (Horizon Discovery, 103-001) або PI3K α з мутацією H1047R/+ (Horizon Discovery, 103-005). Ефективність інгібування pPRAS40 під дією PI3K α в кожній клітинній лінії вимірюють через 24 години після обробки сполукою. Селективність інгібіторів PI3K α відносно її мутантних форм визначають на підставі

співвідношень вираженого в EC_{50} показника ефективності для WT в порівнянні з E545K-несучими клітинними лініями і WT в порівнянні з H1047R-несучими клітинними лініями.

Клітинна культура: клітинні лінії підтримують в інкубаторі для клітинних культур при 37 °C і 5 % CO_2 в середовищі для культивування клітин, що містить RPMI1640 (середовище 1640 від Меморіального інституту Розуелла Парка; отриману від Genentech), 10 % FBS (фетальна теляча сироватка) (Gibco, 16140-071), 2 mM L-глутамін (отриманий від Genentech) і 10 mM HEPES, pH 7,2 (отриманий від Genentech). Кожні 72 години клітини відщеплюють з подальшим розведенням в співвідношенні 1: 8, використовуючи 0,25 %-ний розчин трипсину в EDTA (Gibco, 25200).

Методика аналізу: клітини збирають і висівають в використовуваних в аналізі 384-лункові планшети для роботи з тканинними культурами Greiner, № за каталогом 781 091) та інкубують протягом ночі при 37 °C і 5 % CO_2 . Висівання та аналіз трьох клітинних ліній (WT, E545K і H1047R) проводять паралельно. На наступний день виконують серійні розведення тестованих сполук в диметилсульфоксиді (ДМСО) і додають до клітин (кінцева концентрація ДМСО 0,5 %). Потім клітини інкубують протягом 24 годин при 37 °C і 5 % CO_2 . Через 24 години здійснюють лізис клітин і вимірюють рівні pPRAS40, використовуючи спеціально розроблений набір для аналізу pPRAS40 на 384-лункових планшетах від Meso-Scale (Meso Scale Discovery, № за каталогом L21CA-1). Клітинні лізати додають в використовуваних в аналізі планшети, попередньо покриті антитілами до фосфорильованої PRAS40. Зразки з фосфорильованої PRAS40 залишають для зв'язування з антитілами, що захоплюють, протягом ночі при 4 °C. До лізату після здійснення зв'язування додають детекуюче антитіло (антитіло до загального PRAS40, мічене електрохемілюмінесцентною міткою SULFO-TAG) та інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Додають буфер для зчитування від MSD, завдяки чому при додаванні напруги до електродів планшета, мітки, що зв'язалися з поверхнею електродів, випромінюють світло. Використовуючи прилад Sector від MSD вимірюють інтенсивність світла і виконують кількісні вимірювання вмісту фосфорильованого PRAS40 (фосфо-PRAS40) в зразку. Відсоток інгібування фосфорильовання PRAS40 під дією тестованих сполук в різних концентраціях розраховують відносно необроблених контролів. Значення EC_{50} розраховують, використовуючи 4-параметричну логістичну нелінійну регресійну модель залежності доза-відповідь.

Статистичний аналіз: значення EC_{50} являють собою середнє геометричне значення як мінімум з 4-х незалежних експериментів. Всі статистичні викладки виконували з використанням програмного забезпечення KaleidaGraph (версія 4.1.3). t-Критерій Стюдента для порівняння активності відносно клітин з мутаціями і клітин дикого типу визначали з використанням непарних даних з рівними дисперсіями. Значення $P < 0,05$ вважається статистично значимим.

Приклад 903. Аналізи життєздатності клітин *in vitro*

Клітини висівали (1500 на одну лунку) в 384-лункові планшети на 16 г. На 2-у добу готували по дев'ять серійних розведень (1:3) сполук в ДМСО в 96-лунковому планшеті. Подальші розведення сполук виконували в ростовому середовищі, використовуючи робот Rapidplate® (Zymark Corp.). Розведені сполуки потім додавали в чотирьох повторях в лунки 384-лункових планшетів для клітин і інкубували при 37 °C і 5 % CO_2 . Через 4 доби вимірювали відносні кількості життєздатних клітин на підставі люмінесценції, використовуючи Cell Titer-Glo® (Promega) відповідно до інструкцій виробника, і знімали показання на рідері Wallac Multilabel (Perkin-Elmer). Значення EC_{50} розраховували, використовуючи програмне забезпечення Prism 6.0 (GraphPad).

Приклад 904. Ефективність *in vivo* по відношенню до пухлинних ксенотрансплантатів мишей
Миші: самки мишей з важким комбінованим імунodefіцитом (SCID) (CB-17 SCID.bg, Charles River Labs, San Diego), NOD.SCID (Charles River Labs, Hollister) або безтимусних NCR-мишей (Taconic) на 0-у добу дослідження перебували у віці 8-9 тижнів і мали BW в діапазоні від 18 до 26 грамів. Тварини отримували воду без обмеження і лабораторний автоклавований корм для гризунів 5010 (LabDiet, St. Louis, MO). Мишей тримали в мікроізоляторах в умовах 12-годинного світлового циклу. Genentech точно відповідає рекомендаціям Керівництва по утриманню та використанню лабораторних тварин щодо обмеження, умов утримання, хірургічних процедур, регулювання годування і прийому рідини і ветеринарного обслуговування. Програма за змістом і використанню тварин в Genentech акредитована Міжнародною асоціацією по атестації і акредитації (умов) утримання лабораторних тварин (AAALAC International), яка забезпечує дотримання прийнятих стандартів по утриманню та використанню лабораторних тварин. Мишей в Genentech тримали в стандартних клітках-мікроізоляторах для гризунів і давали можливість адаптуватися до умов дослідження протягом щонайменше 3 діб перед імплантацією пухлинних клітин. Для дослідження використовували тільки тварин, які виявилися здоровими й у яких не було виявлено явні порушення.

Імплантація пухлин: процедури ксенотрансплантації починали, використовуючи або ракові клітини (HCC1954x1 або KPL4), або пасажем пухлин (HCl-003). Клітини культивували в середовищі RPMI 1640 року, доповненої 10 % фетальної телячої сироватки, 2 мМ глутаміном, пеніциліном в концентрації 100 одиниць/мл, стрептоміцину сульфатом в концентрації 100 мкг/мл (мікрограмів в одному мл) і гентаміцином в концентрації 25 мкг/мл, збирали в логарифмічній фазі росту і ресуспендували в 50 %-ному матригелі (Matrigel, Becton Dickinson Bioscience; San Jose, CA), що не містить фенольного червоного, і збалансованому сольовому розчин Хенкса в кількості 3×10^6 або 5×10^6 клітин/мл залежно від часу подвоєння кількості клітин в лінії. У випадку моделі, що походить від пацієнта лінії HCl-003, виконували підшкірну імплантацію кульок бджолиного воску масою 30 мг, що містять приблизно 1 мг 17 β (бета)-естрадіолу, за 3 доби до імплантації фрагментів пухлини. Пухлинні клітини або фрагменти імплантували на глибину 2/3 жирової подушки молочної залози і моніторинг пухлинного росту виконували до моменту потрапляння середнього розміру в цільовий діапазон 100-250 мм³. Після того, як більшість пухлин досягало цільового діапазону, мишей розділяли на групи з 7-10 мишей з урахуванням об'єму пухлин.

Терапевтичні агенти: PI3K-інгібуючі сполуки поставляли у вигляді сухого порошку в формі вільної основи і зберігали при кімнатній температурі з захистом від світла. В якості розчинника для таселісибу (GDC-0032) і BYL719 використовували суміш 0,5 % метилцелюлози/0,2 % твіну 80 (MCT) в деіонізованій воді. В якості контрольного розчинника для сполуки 101 використовували наносуспензію 0,5 % метилцелюлози/0,2 % твіну 80 (MCT). Наносуспензію MCT одержують, спочатку готуючи суспензію MCT. Після приготування суспензії використовують скляні кульки діаметром 1 мм і магнітний стрижень з рідкоземельного елемента для перемішування з метою подрібнення суспензії MCT протягом приблизно 24 годин з одержанням наносуспензії з дрібних частинок. Для перевірки кінцевого розміру часток використовували аналізатор розміру частинок. Дози лікарських засобів готували один раз на тиждень і зберігали при 4 °C.

Обробка: миші одержували п/о з використанням шлункового зонда один раз на добу протягом 21-28 діб (розчинник) або задане дозування PI3K-інгібуючих сполук в мг/кг (виражене у вигляді еквівалента вільної основи) в об'ємі 100мкл (мікролітрів) (5 мл/кг).

Очікуваний результат: об'єм пухлини вимірювали в 2-х напрямках (за довжиною і шириною), використовуючи циркулі Ultra Cal IV (модель 5410111; Fred V. Fowler Company), як наведено нижче: об'єм пухлини (мм³) = (довжина x ширина²) x 0,5, і аналізували з використанням Excel-версії 11.2 (Microsoft Corporation). Щоб провести аналіз повторного вимірювання об'ємів пухлин в часі у одних і тих же тварин, використовували підхід із застосуванням лінійної моделі зі змішаними ефектами (LME) (Pinheiro J., et al., Nlme: linear and nonlinear mixed effects models 2009; пакет програм R, версія 3.2.5). Такий підхід передбачає як повторні вимірювання, так і незначні кількості вибухів з дослідження внаслідок будь-якої не пов'язаної з лікуванням загибелі тварин до завершення дослідження. Для апроксимації нелінійного профілю залежності об'єму пухлини (в log₂ координатах) від часу лікування при кожному рівні доз використовували кубічну сплайн-регресію. Потім ці нелінійні профілі співвідносили з дозою в рамках моделі зі змішаними ефектами. Інгібування росту пухлини в процентному відношенні до контролю-розріджувача (% TGI) розраховували як процентне відношення площі під кривою, отриманого за допомогою апроксимації (area under the fitted curve; AUC), для групи, яка приймає відповідну дозу на добу, відносно розчинника, використовуючи наступну формулу: % TGI = 100 x (1 - AUC_{доза}/AUC_{розб.}). Відповідно до цієї формули значення TGI, рівне 100 %, вказує на зупинку росту пухлини, значення TGI більше (>) 1 %, але менше (<) 100 % вказує на затримку пухлинного росту, а значення TGI більше (>) 100 % вказує на регресію пухлини. Часткову відповідь (PR) для тварини визначали як регресію пухлини, складову більше (>) 50 %, але менше (<) 100 % від початкового об'єму пухлини. Повну відповідь (CR) визначали як 100 %-ну регресію пухлини (тобто пухлину, що не піддається виміру) в будь-який день в ході дослідження.

Токсичність: тварин зважували один раз на добу протягом перших п'яти діб дослідження і після цього два рази на тиждень. Маси тіла тварин вимірювали, використовуючи ваги Adventurer Pro® AV812 (Ohaus Corporation). Зміну маси у відсотках розраховували так, як наведено нижче: зміна маси тіла (%) = [(маса друга доба - маса 0-а доба)/маса 0-а доба] x 100. Мишей часто оглядали, відстежуючи виражені ознаки будь-яких несприятливих, пов'язаних з лікуванням побічних ефектів, і реєстрували клінічні ознаки токсичності при їх виявленні. Прийнятну токсичність визначають як токсичність, що приводить до середньої втрати маси тіла (BW) в групі, що становить менше 20 % в ході дослідження, і не більше ніж до одного випадку смерті в результаті лікування (TR death) з десяти підданих лікуванню тварин. Будь-який режим

введення, який призводить до більш високої токсичності, вважається таким, що перевищує максимальну дозу, що переноситься (MTD). Смерть класифікують як смерть, яка є результатом лікування (TR), якщо вона пов'язана з побічними ефектами лікування, що підтверджено клінічними ознаками та/або результатами розтину, або також може бути класифікована як TR, якщо вона обумовлена невідомими причинами під час періоду введення або протягом 10 діб після введення заключної дози. Смерть класифікують як таку, що не є результатом лікування (NTR), якщо немає ніяких доказів того, що смерть була пов'язана з побічними ефектами лікування.

Приклад 905. Клітинна культура і експерименти з інгібіторами *in vitro*

Клітинні лінії вирощували в стандартних умовах культивування тканин в середовищі RPMI з 10 % фетальної телячої сироватки, пеніциліном (100 од./мл) і стрептоміцином (100 мкг/мл). HCC-1954 і HDQ-P1 є лінії ракових клітин молочної залози (Американська колекція типових культур; Manassas, VA). Клітини HCC-1954 і HDQ-P1 поміщали в кожну лунку 6-лункового планшета для тканинних культур в кількості 80000 клітин/лунка та інкубували при 37 °C протягом ночі. Клітини інкубували з кожного із сполук в зазначених концентраціях протягом 24 годин. Після інкубації клітини промивали один раз холодним забуференим фосфатом фізіологічним розчином (PBS) і лізували в буфері для екстракції клітин Biosource™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), доповненому інгібіторами протеаз (F. Hoffman-LaRoche; Mannheim, Germany), 1 mM фенілметилсульфоніл-фторидом і сумішами 1 і 2 інгібіторів фосфатаз (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Концентрації білка визначали, використовуючи набір для аналізу білків із застосуванням біцинхонінової кислоти (BCA) Pierce (Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL).

Аналізи білків

Концентрацію білка визначали, використовуючи набір для аналізу білків із застосуванням BCA від Pierce (Rockford, IL). Для одержання імуноблотів проводили розділення рівних кількостей білків електрофорезом в 4-12 %-них біс-трис-градієнтних гелях NuPage™ (Invitrogen; Carlsbad, CA); білки переносили на нітроцелюлозні мембрани, використовуючи систему IBlot і протокол від Invitrogen. Антитіла до p110альфа і фосфор-Akt (Ser473) одержували від Cell Signaling (Danvers, MA). Антитіла до β -актину і GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) надходили від Sigma.

Приклад 906. Експресія CD69 В- клітинами, аналіз в цільній крові людини по відношенню експресії CD69 в CD19⁺ CD27⁺ В-клітинах

Клітинна культура: цільну кров людини розливали в 96-лункові планшети з глибокими лунками в об'ємі 100 мкл на одну лунку. Сполуки розбавляли в ДМСО для одержання бажаних вихідних концентрацій, потім додатково розбавляли в PBS до бажаної робочої концентрації і додавали в об'ємі 5,5 мкл на одну лунку. Потім зразки інкубували протягом 1 години при 37 °C в умовах 5 % CO₂, після чого додавали 5 мкг (10 мкл на одну лунку) козячих F(ab')₂ проти IgM (Southern Biotech, AL) та інкубували протягом 18 годин при 37 °C в умовах 5 % CO₂. Всі варіанти обробок тестували в двох повторях.

Методики виділення і фарбування клітин: після інкубації рівень експресії CD69 в CD19⁺ CD27⁺ клітинах визначали за допомогою фарбування зразків цільної крові сумішшю, що містить CD27: 10 мкл/лунка (клон L128; BD Biosciences, NJ), CD19: 7,5 мкл/лунка (клон SJ25C1; BD Biosciences, NJ) і CD69: 10 мкл/лунка (клон FN50; BD Biosciences, NJ). Крім цього цільну кров людини від кожного донора фарбували, використовуючи ізотипічні подібні флуоресцентні контрольні антитіла. Після додавання суміші відповідних антитіл зразки цільної крові фарбували протягом 30 хвилин в темряві і потім здійснювали лізис зразків, використовуючи BD Pharm Lysis™ (BD Bioscience, NJ). Далі одержані зразки промивали буфером для FACS (метод сортування флуоресцентно-активованих клітин) (забуферений фосфатом фізіологічним розчином (без Ca/Mg⁺⁺), що містить 1 mM EDTA, 25 mM HEPES, pH 7,0, 1 % фетальної телячої сироватки (інактивованої нагріванням)) і фіксували в буфері для FACS, доповненому 0,1 % формальдегіду (Polysciences Inc., PA) і 0,1 % плуроніку F-68 (Sigma, MO). Збір даних здійснювали, використовуючи установку LSR-II від BD (BDBiosciences) з програмним забезпеченням FACSDiva від BD.

Експресія CD69 в CD19⁺ CD27⁺ В-клітинах. Рівні CD19, CD27 і CD69 в клітинах оцінювали за допомогою проточної цитометрії, використовуючи програмне забезпечення FACSDiva від BD, і визначали середню інтенсивність флуоресценції при експресії CD69 (CD69 MFI-Mean) в популяції CD19⁺CD27⁺-лімфоцитів. Концентрацію сполуки, що викликає зменшення CD69 MFI-Mean на 50 % (IC₅₀), визначали, використовуючи програмне забезпечення Genedata (Genedata Screener, MA).

Приклад 907. EC₅₀ для pPRAS40 в HCC1954 і HDQP1

Клітини висівають в використовувані в аналізі 384-лункові планшети для роботи з тканинними культурами та інкубують протягом ночі. На наступний день клітини обробляють сполуками та інкубують протягом 24 годин. Через 24 години здійснюють лізис клітин і вимірюють рівні pPRAS40, використовуючи аналітичну платформу від Meso-Scale. Ці клітинні лінії є дуже

корисними для характеристики селективності інгібіторів PI3Ka в разі мутантних форм PI3Ka. Клітинна лінія HCC1954 експресує мутантну форму PI3Ka (з мутацією E545K) в порівнянні з WT в HDQP1.

Принцип аналізу: платформа від MSD надає можливість проведення методу вимірювання рівнів фосфорилування в разі pPRAS40 в одному зразку. Клітинні лізати додають в використовувані в аналізі планшети, попередньо покриті антитілами до загального PRAS40. Після лізису клітин зразки залишають для здійснення зв'язування PRAS40 із захоплюючими антитілами. Детектуюче антитіло (антіфосфо-PRAS40), мічене електрохемілюмінесцентною сплукою SULFO-TAG від MSD, додають до лізату, в якому відбулося зв'язування. Додають буфер для зчитування від MSD, завдяки чому при додатку напруги до електродів планшета, мітки, пов'язані з поверхнею електродів, випромінюють світло. Використовуючи прилад Sector від MSD вимірюють інтенсивність світла і кількість фосфо-EGFR (фосфорильованого рецептора епідермального фактора росту) в зразку (принцип аналізу Meso Scale).

Матеріали

Використовуваний в аналізі планшет	Чорні 384-лункові стерильні планшети для роботи з тканинними культурами (TC) з u-образними лунками з прозорим дном (Greiner, № за каталогом 781091)
Типи клітин	Батьківська лінія WT: HDQ-P1 (CL131963) Лінія з мутацією E545K: HCC1954 (CL130216)
Середовище	RPMI 1640, 10 % FBS (Gibco 16140-071), 2 мМ L-глутамін (GNE (від англ. Grade not established - марку не встановлено), для внутрішнього користування), 1 % HEPES (GNE, для внутрішнього користування)
Інші реагенти для культивування клітин	0,25 %-ний трипсин-EDTA 1X (Invitrogen Gibco, № за каталогом 25200)
Набір реагентів для аналізу	Спеціально розроблений набір для аналізу pPRAS40 в лізаті цільних клітин на 384-лункових планшетах від Meso-Scale (Meso Scale Discovery, № за каталогом L21CA-1 для 100 планшетів).

Методика

- Одержані сполуки використовують в 2 мМ концентрації в ДМСО. Підготувати планшет для титрування розчину сполук в ДМСО в співвідношенні 1:3 з використанням чистого ДМСО.

- Материнський планшет для розведення в ДМСО містить по 72 мкл розчину кожної з 13 сполук.

- Контрольна сполука з селективністю відносно мутацій: додати по 72 мкл 2 мМ розчину контрольної сполуки в лунки B2 кожного використовуваного в аналізі планшета. Ця контрольна сполука демонструє приблизно в 20 разів більш високу ефективність в клітинній лінії HCC1954 в порівнянні з лінією HDQP1.

- Використовуючи багатоканальну піпетку, перенести за 36 мкл з кожної лунки з сполукою в лунку, розташовану безпосередньо нижче, (наприклад, з B2 в C2) для побудови другої копії кривих залежності доза-відповідь.

- Використати метод із застосуванням пристрою Biomek FX під назвою "SLS_serial dilution/1 plate_384_3_13_3x" для виконання серійних розведень сполук в материнському планшеті.

- Герметично закрити і зберігати як материнський, так і дочірній планшети для розведення в ДМСО, якщо вони безпосередньо не використовуються, в умовах термоізоляції.

1-а доба: культивування клітин в планшетах

1. Висіяти по 12500 клітин в 45 мкл середовища для кожної клітинної лінії. Дати можливість клітинам осісти/прикріпитися до планшета протягом 15-20 хв. при кімнатній температурі.

2. Інкубувати клітини протягом ночі при 37 °C в інкубаторі з регулюванням вологості і вмісту CO₂.

2-а доба: підготовка планшета з сполуками і обробка сполуками

1. Відносно планшета для виконання проміжних 10-кратних розведень: додати по 95 мкл безсироваткового середовища в 384-лунковий поліпропіленовий планшет від Greiner з лунками стандартного профілю.

2. Для виконання проміжного розведення сполук в середовищі і додавання до клітин використовувати протокол для Biomek FX: "SLS Intermed Dil Add 5 ul to Cells July 13 2012". Згідно з цим протоколом Biomek перенести по 5 мкл з дочірнього планшета для ДМСО в планшет для проміжного розведення сполук, що містить в лунках по 95 мкл середовища, і провести перемішування середовища з сполуками. Потім, згідно з даним методом, перенести по 5 мкл з планшета для проміжного розведення сполук до відповідних лунок планшета для клітин.

3. Інкубувати оброблені клітини при 37 градусах протягом 24 годин в інкубаторі з зволоженням і 5 % CO₂.

3-а доба: лізування клітин і додавання в планшети від MSD

Блокувати використовуваний в аналізі планшет від MSD, застосовуючи 50 мкл 3 %-ного розчину блокуючого засобу А в 1X буфері для промивання від MSD, протягом 1-2 г при кімнатній температурі. Цей розчин можна зберігати при 4 °C протягом до одного місяця включно. Блокуючий буфер А містить 1X буфер для промивання від MSD (20 мл 1X трис-буфера для промивання і 600 мг блокуючого засобу А).

Приготування лізуючого буфера

	Для 3 планшетів (мл)	Для 6 планшетів (мл)	Для 9 планшетів (мл)	Для 12 планшетів (мл)
Лізуючий буфер від MSD	65,0	120	180	240
Суміш 1 інгібіторів фосфатаз (або суміш 2 інгібіторів фосфатаз, № за каталогом Sigma P5726-5 мл)	0,65	1,2	1,8	2,4
Суміш 2 інгібіторів фосфатаз (або суміш 3 інгібіторів фосфатаз, № за каталогом Sigma P0044-5 мл)	0,65	1,2	1,8	2,4
Суміш інгібіторів протеаз (або суміш з № за каталогом Sigma P2714-1BTL, ресуспендована в 10 мл PBS)	0,65	1,2	1,8	2,4

Видалити відсмоктуванням середовища і виконати лізування клітин.

1. Виконати лізування клітин в 50 мкл лізуючого буфера. Лізування виконувати при кімнатній температурі протягом 10-20 хвилин на планшетному шейкері.

2. Поки здійснюється лізування клітин, промити блокувані планшети 1x буфером для промивання від MSD.

3. Перенести за 42 мкл лізатів (21 + 21 мкл) у блокуваний використовуваний в аналізі pPRAS40 планшет від MSD.

4. Герметично закрити планшети від MSD та інкубувати при 4 °C з струшуванням протягом ночі.

4-а доба: аналіз/детекція згідно протоколу MSD

8. Приготувати розчин, що містить 1 % блокуючого засобу А в 1X буфері для промивання від MSD. (20 мл 1X трис-буфера для промивки і 200 мг блокуючого засобу А (1 %, мас./об.)). Цей розчин можна зберігати при 4 °C протягом до одного місяця включно.

9. Промити планшети від MSD 1x буфером для промивання від MSD.

10. Додати в планшети за 10 мкл розчин розведеного міченого SULFO-TAG детектуного антитіла. Інкубувати протягом 1 г зі струшуванням при кімнатній температурі.

	Для 3 планшетів (мл)	Для 6 планшетів (мл)	Для 9 планшетів (мл)	Для 12 планшетів (мл)
1 % блокуючого засобу А в буфері для промивання від MSD	13,0	25,0	36,0	48,0
2 % блокуючого засобу DM (100x)	0,13	0,25	0,36	0,48
Мічене SULFO-TAG анти-pPRAS40 (50x)	0,26	0,5	0,72	0,96

11. Промити планшети 4 рази 1х буфером для промивання від MSD.

12. Додати по 35 мкл 1х буфера для зчитування, використовуючи реверсивне піпетування і уникаючи утворення бульбашок.

13. Негайно зчитати планшет на приладі SECTOR від MSD.

Приклад 908. Сумісна кристалографія з p110α (альфа)

Укорочену за N-кінцем p110α (альфа) одержували згідно Chen і др. і Nacht і др. (Chen P., Y.L. Deng, S. Bergqvist, M.D. Falk, W. Liu, S. Timofeevski and A. Brooun "Engineering of an isolated p110α subunit of PI3Kα permits crystallization and provides a platform for structure-based drug design", (2014) Protein Sci., 23(10): 1332-1340; Nacht M. et al. (2013) "Discovery of a potent and isoform-selective targeted covalent inhibitor of the lipid kinase PI3K", J. Med. Chem. 56(3): 712-721).

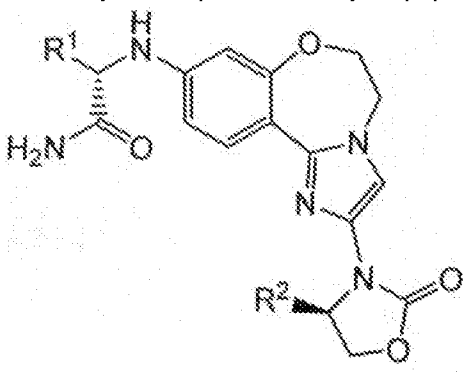
Для одержання кристалів в присутності розроблених сполук застосовували стандартні протоколи. Зібрані кристали до одержання дифракційних даних зберігали шляхом занурення в рідкий азот і поміщали в канал синхротрона, що дає монохроматичне рентгенівське випромінювання. Дифракційні дані збирали, обробляли і об'єднували, використовуючи стандартні протоколи. Елементарні осередки і просторова група кристалів були ізоморфні таким, наведеними раніше (Nacht, 2013; Chen, 2014 року). Розміщення розроблених сполук в картах електронної щільності і уточнення кристалічної структури до меж дозволу в діапазоні від 2,36 до 2,56 Å проводили, використовуючи стандартні протоколи.

У даній заявці одиниці мкл, мкмоль і т.д. означають мікролітр, мікромоль і т.д.

Хоча викладений вище винахід для ясності розуміння описано досить докладно за допомогою ілюстрації і прикладів, ці описи і приклади не слід тлумачити як обмежуючі обсяг даного винаходу. Описи всієї патентної та наукової літератури, наведеної в даному описі, явно включені в усій своїй повноті за допомогою посилання.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука, вибрана зі сполуки формули I:



та її стереоізмери, геометричні ізомери, таутомери і фармацевтично прийнятні солі, де:

R¹ вибраний з -CH₃, -CH₂CH₃, циклопропілу і циклобутилу;

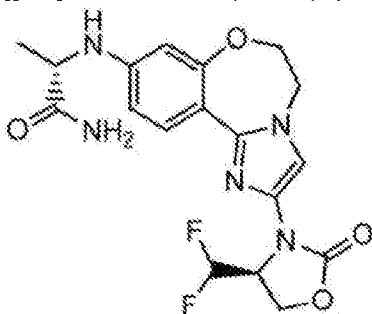
R² вибраний з -CH₃, -CHF₂, -CH₂F і -CF₃.

2. Сполука за п. 1, де R¹ являє собою CH₃ або циклопропіл.

3. Сполука за п. 1 або п. 2, де R² являє собою -CHF₂.

4. Сполука, що являє собою:

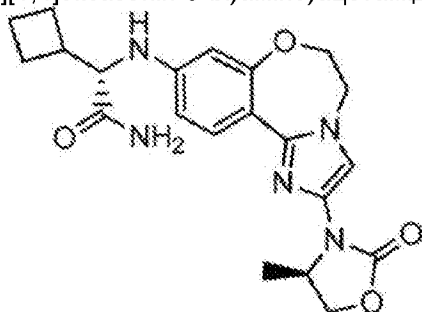
(S)-2-((2-((S)-4-(дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)пропанамід:



або її фармацевтично прийнятна сіль.

5. Сполука за п. 1, де сполука формули I являє собою:

(S)-2-циклобутил-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід:

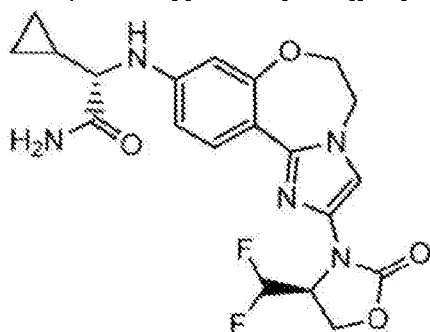


5

або її фармацевтично прийнятна сіль.

6. Сполука за будь-яким з пп. 1-3, де сполука формули I являє собою:

(S)-2-циклопропіл-2-((2-((S)-4-(дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід:

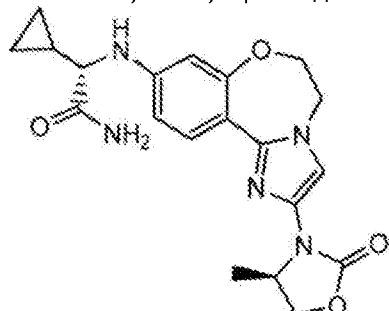


10

або її фармацевтично прийнятна сіль.

7. Сполука за будь-яким з пп. 1-2, де сполука формули I являє собою:

(S)-2-циклопропіл-2-((2-((R)-4-метил-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід:

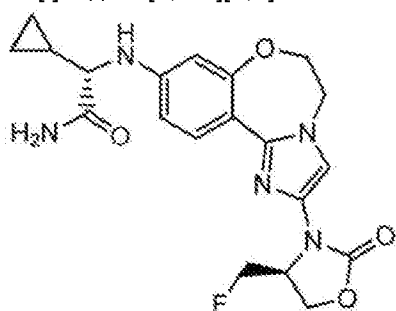


15

або її фармацевтично прийнятна сіль.

8. Сполука за будь-яким з пп. 1-2, де сполука формули I являє собою:

(S)-2-циклопропіл-2-((2-((S)-4-(фторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)ацетамід:

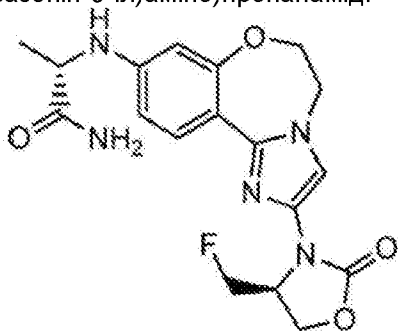


20

або її фармацевтично прийнятна сіль.

9. Сполука за будь-яким з пп. 1-2, де сполука формули I являє собою:

(S)-2-((2-((S)-4-(фторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)пропанамід:

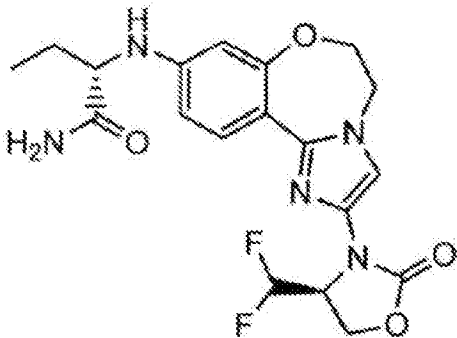


5

або її фармацевтично прийнятна сіль.

10. Сполука за будь-яким з пп. 1, 3, де сполука формули I являє собою:

(S)-2-((2-((S)-4-(дифторметил)-2-оксооксазолідин-3-іл)-5,6-дигідробензо[f]імідазо[1,2-d][1,4]оксазепін-9-іл)аміно)бутанамід:



10

або її фармацевтично прийнятна сіль.

11. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким з пп. 1-10 і фармацевтично прийнятний носій, речовину, що сприяє ковзанню, розчинник або ексципієнт.

12. Фармацевтична композиція за п. 11, де фармацевтично прийнятний носій, речовина, що сприяє ковзанню, розчинник або ексципієнт вибрано з діоксиду кремнію, порошкоподібної целюлози, мікрокристалічної целюлози, стеаратів металів, алюмосилкату натрію, бензоату натрію, карбонату кальцію, силікату кальцію, кукурудзяного крохмалю, карбонату магнію, тальку, що не містить азбесту, стеаровету С, крохмалю, крохмалю 1500, лаурилсульфату магнію, оксиду магнію та їх комбінацій.

13. Спосіб приготування фармацевтичної композиції, що включає комбінування сполуки за будь-яким з пп. 1-10 з фармацевтично прийнятним носієм, речовиною, що сприяє ковзанню, розріджувачем або ексципієнтом.

14. Спосіб лікування раку у пацієнта з діагнозом рак, який включає введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-10, при цьому даний рак вибраний з раку молочної залози і недрібноклітинного раку легені.

15. Спосіб за п. 14, що додатково включає введення пацієнту додаткового терапевтичного агента, вибраного з 5-фторурацилу (5-FU), доцетакселу, ерибуліну, гемцитабіну, кобіметинібу, іпатасертибу, паклітакселу, тамоксифену, фулвестранту, GDC-0810, дексаметазону, палбоциклібау, бевацизумабу, пертузумабу, трастузумабу емтанзину, трастузумабу і летрозолу.

16. Спосіб за п. 14, де рак являє собою рак молочної залози.

17. Спосіб за п. 16, де рак молочної залози являє собою позитивний за рецепторами естрогенів (ER+) рак молочної залози.

18. Спосіб за п. 16, де рак молочної залози є раком базального або люмінального підтипу.

19. Спосіб за п. 14, де при даному виді раку експресується PIK3CA (від англ. phosphatidylinositol-3-kinase, catalytic subunit alpha - каталітична альфа-субодиниця фосфатидилінозитол-3-кінази) з мутацією, вибраною з E542K, E545K, Q546R, H1047L і H1047R.

20. Спосіб за п. 14, де при даному виді раку експресується мутантна форма PTEN (від англ. phosphatase and tensin homolog - гомолог фосфатази і тензину).

21. Спосіб за п. 16, де даний вид раку являє собою HER2 (від англ. human epidermal growth factor receptor 2 - рецептор епідермального фактора росту людини 2 типу)-позитивний рак.

22. Спосіб за п. 16, де пацієнт є HER2-негативним, ER(рецептор естрогену)-негативним і PR(рецептор прогестерону)-негативним.

5 23. Набір для терапевтичного лікування раку молочної залози, що містить:

а) фармацевтичну композицію за п. 11 або п. 12; і

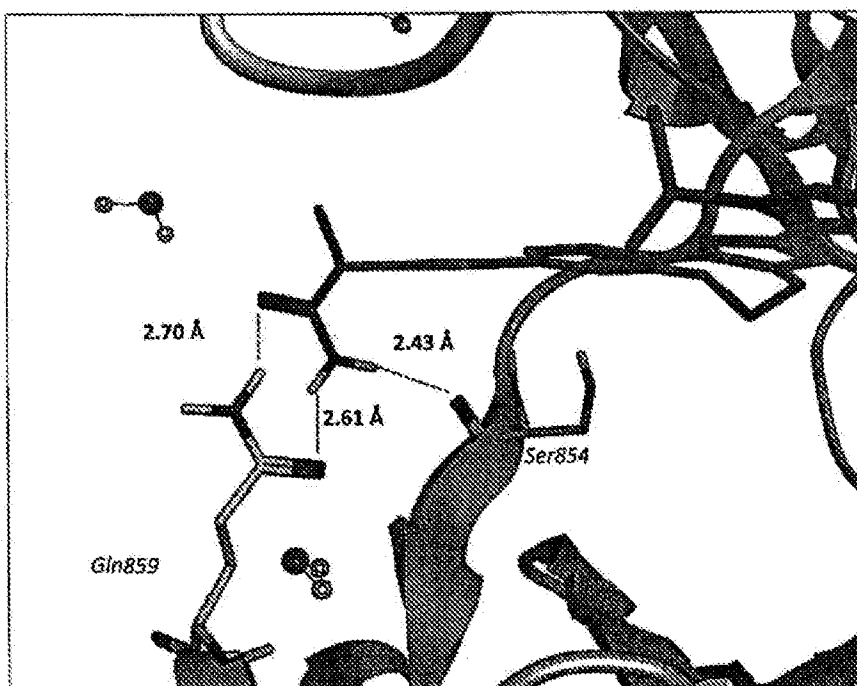
б) інструкції для застосування при терапевтичному лікуванні раку молочної залози.

24. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-10 для лікування раку у пацієнта, причому даний рак вибраний з раку молочної залози і недрібноклітинного раку легені.

10 25. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-10 для виготовлення лікарського засобу для лікування раку у пацієнта, причому даний рак вибраний з раку молочної залози і недрібноклітинного раку легені.

26. Сполука за будь-яким з пп. 1-10 для застосування для лікування раку у пацієнта, причому даний рак вибраний з раку молочної залози і недрібноклітинного раку легені.

15



ФІГ. 1А

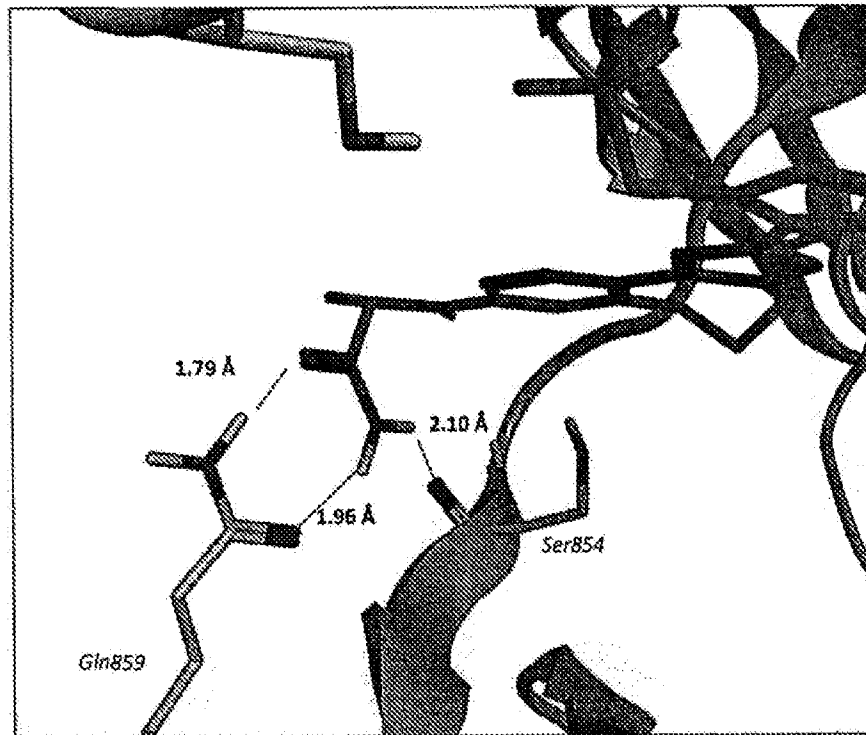
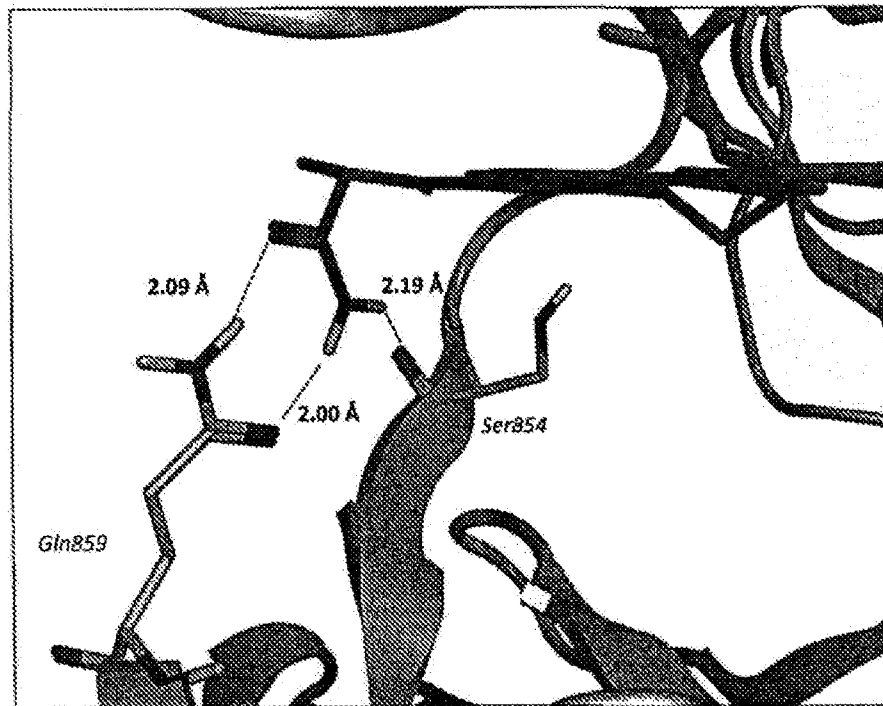
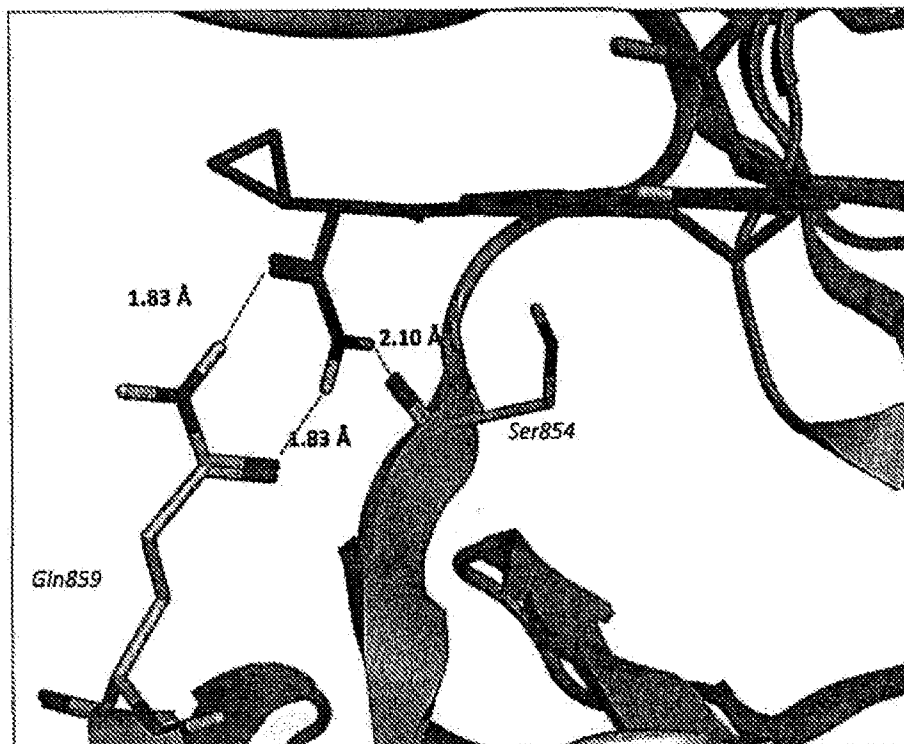


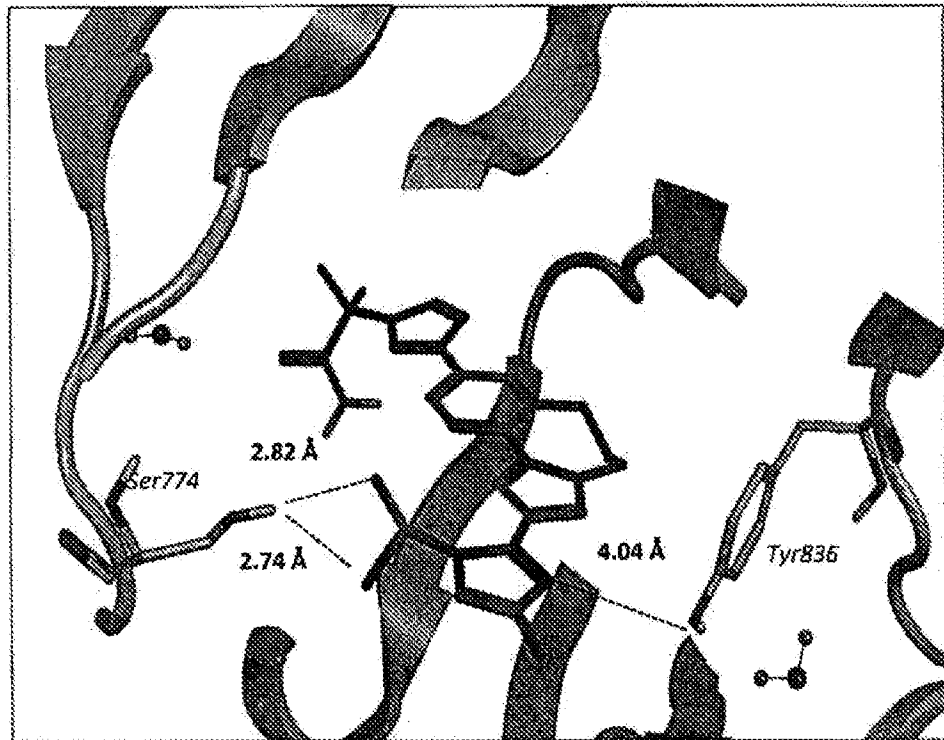
FIG. 1B



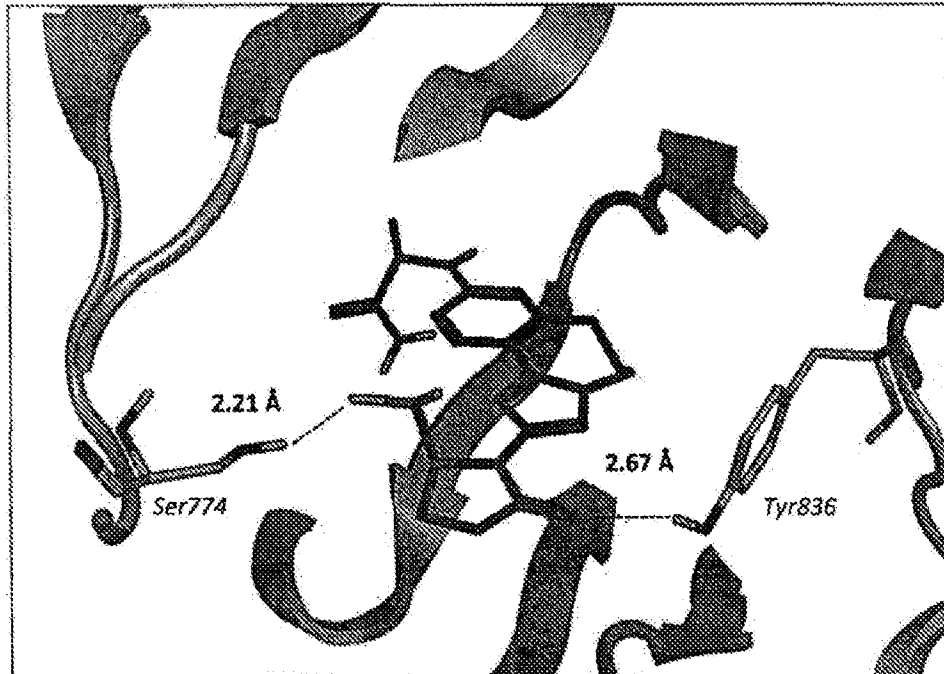
ΦΙΓ. 1C



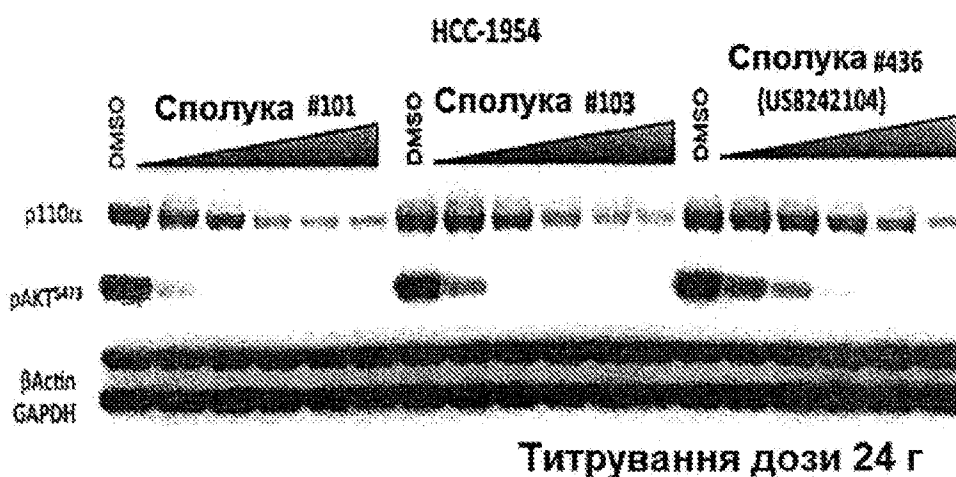
ΦΙΓ. 1D



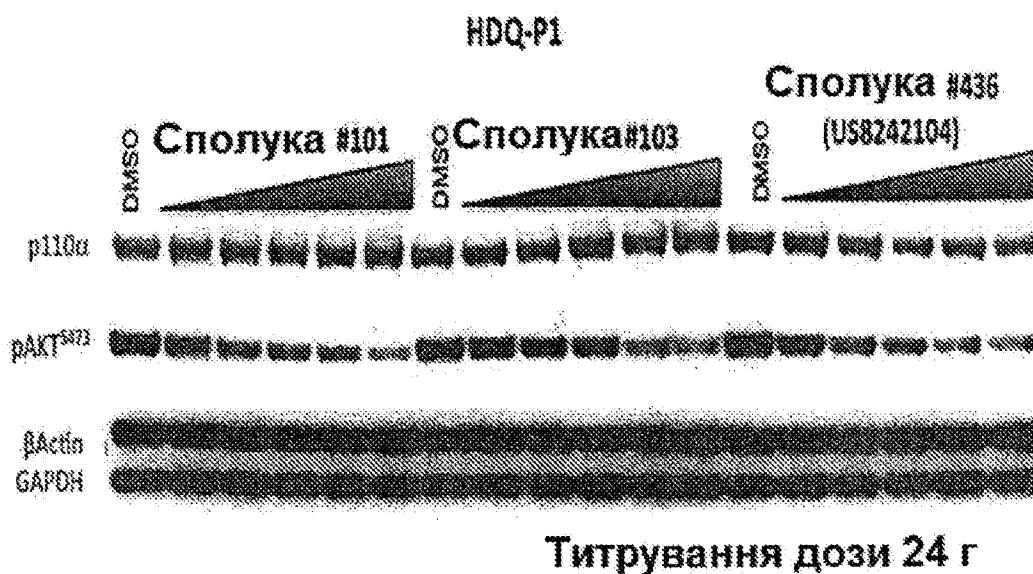
ΦΙΓ. 2Α



ΦΙΓ. 2Β



ФІГ. 3А



ФІГ. 3В

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601