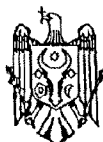




MD/EP 3524601 T2 2022.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3524601 (13) T2

(51) Int. Cl: C07D 471/04 (2006.01.01)

A61P 35/00 (2006.01.01)

A61K 31/519 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0893 (22) Data de depozit: 2016.12.12 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16918763.0, 2016.12.12 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3524601, 2019.08.14 (31) Numărul cererii prioritare: 2016139641 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.10.10 (33) Țara cererii prioritare: RU	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 02/2022, 2022.02.28 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 41/2021, 2021.10.13 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2019, 2019.09.30
(71) Solicitanți: R-PHARM JOINT STOCK COMPANY (R-PHARM, JSC), RU; REPIK, Alexey Evgenievich, RU (72) Inventatori: REPIK Alexey Evgenievich, RU; IVACHTCHENKO Alexandre Vasilievich, US; IGNATIEV Vasily Gennadievich, RU; CHAFEEV Mikhail Airatovich, RU (73) Titulari: R-PHARM JOINT STOCK COMPANY (R-PHARM, JSC), RU; REPIK, Alexey Evgenievich, RU (74) Mandatar autorizat: GLAZUNOV Nicolae	

(54) N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamida solvat de dimetil sulfoxid ca un inhibitor MEK1/2

(57) Rezumat:

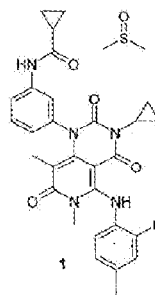
1

Scopul invenției de față este de a crea noi inhibitori ai MEK1, MEK2 și MEK1/2, care vor avea toxicitate mai mică în dozare pe termen lung. Acest scop este atins de compusul N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid cu formula 1.

Revendicări: 10

Figuri: 2

2



(54) N-{3-[3-cyclopropyl-5-(2-fluoro-4-iodophenylamino)-6,8-dimethyl-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahydro-2h-pyrido[4,3-d]pyrimidin-1-yl]-phenyl}-cyclopropanecarboxamide dimethyl sulphoxide solvate as an mek1/2 inhibitor

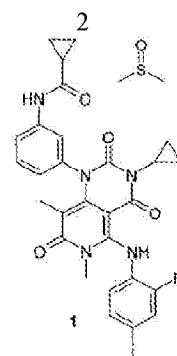
(57) Abstract:

1

The aim of the present invention is to create novel MEK1, MEK2 and MEK1/2 inhibitors which have lower toxicity in long-term dosage. This aim is achieved by the novel compound N- {3-[3-cyclopropyl-5-(2-fluoro-4-iodophenylamino)-6,8-dimethyl-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrido[4,3-d]pyrimidin-1-yl]-phenyl}-cyclopropanecarboxamide dimethyl sulfoxide solvate of formula 1

Claims: 10

Fig.: 2



Descriere:

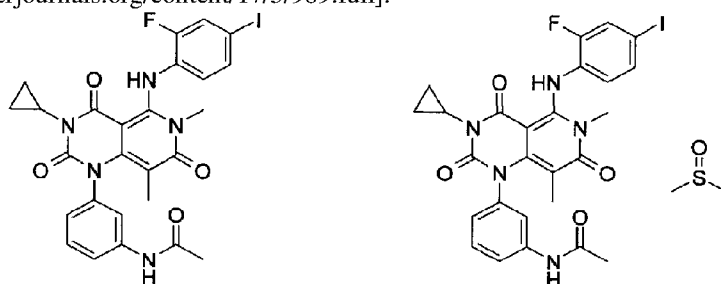
(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)

Domeniul tehnic

- 5 Această invenție se referă la noi derivați de pirido[4,3-d]pirimidin-2,4,7-trionă, adică N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid, care este un medicament interesant pentru tratamentul tulburărilor cauzate de proliferarea celulară adversă, în special ca agent antitumoral. Mai specific, această invenție se referă la inhibitori ai MEK1, MEK2 și MEK1/2 interesați
- 10 ca medicamente anti-tumorale, care pot fi utilizate pentru tratamentul melanoamelor maligne.

Stadiul tehnicii

- Există inhibitori ai MEK1, MEK2 și MEK1/2 bine cunoscuți, a căror structură include 1H,6H-pirido[4,3-d]pirimidin-2,4,7-trionă [WO 2005/121142, WO 2012/088033, USA 7378423], cel mai avansat medicament fiind mekinist (trametinib dimetil sulfoxid, GSK1120212) [H. Abe, S. Kikuchi, K.
- 15 Hayakawa et al. ACS Med. Chem. Lett. 2011, 2, 320-324]. GSK1120212 este un inhibitor al MEK1/2 eficient, care prezintă eficiență mai mare împotriva u-MEK1/2 înainte de activarea C-Raf (u-MEK1: IC₅₀ = 0.7 nM) comparativ cu cel preactivat (pp-MEK1: IC₅₀ = 14.9 nM) [http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/5/989.full].

**Trametinib****Mekinist (GSK1120212)**

- 20 Cu toate acestea, trametinib și mekinist sunt practic insolubili în medii apoase cu pH între 2 și 8. Trametinib și mekinist sunt de asemenea foarte slab solubili în solvenți organici, incluzând cei foarte polari (slab solubili în solvenți aprotici).

- Acesta este faptul pentru care compușii, care pot demonstra profiluri de eficiență favorabile cu privire la MEK1, MEK2 și MEK1/2, și foarte solubili în solvenți organici, sunt încă ceruți. Datorită biodisponibilității îmbunătățite, acești compuși este de așteptat să fie mai solubili ca agenți terapeutici
- 25 pentru cancer.

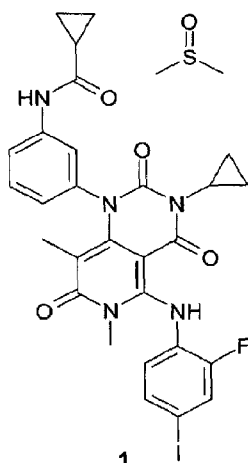
- În afară de aceasta, deși mekinist are o toxicitate orală la doză unică mică (LD₅₀ > 2000 mg/kg pentru șoareci), o pierdere de greutate critică, sau uneori chiar moartea animalului, sunt observate în timpul administrării unui nivel de doză ridicat pe termen lung. Astfel, o cercetare a produșilor cu
- 30 toxicitate mai mică a dozei pe termen lung din acest grup rămâne foarte importantă.

Scopul invenției de față este de a crea noi inhibitori ai MEK1, MEK2 și MEK1/2, care vor avea toxicitate mai mică în dozare pe termen lung.

- Acest scop este atins de compusul N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid cu formula 1.
- 35

Dezvăluirea invenției

Subiectul acestei invenții este N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid cu formula 1.



Solicitanții au descoperit în mod neașteptat că noul compus N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid cu formula 1 este comparabil cu trametinib ca eficiență față de MEK1, MEK2 și MEK1/2, fiind netoxic la dozarea pe termen lung.

De aceea, noul compus N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid cu formula 1 poate fi în special util în profilaxia și/sau în tratamentul tulburărilor care implică MEK1, MEK2 și MEK1/2, de ex. în tratamentul cancerului, incluzând melanoamele maligne, cancerul menționat fiind selectat dintre tumoare cerebrală, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de ficat, cancer pancreatic, cancer colorectal, cancer de plămâni, cancer renal, cancer mamar, cancer ovarian, cancer de prostată, cancer cutanat, neuroblastom, sarcom, osteocondrom, osteom, osteosarcom, seminom, tumori extragonadale, tumoare testiculară, cancer uterin, cancer al capului și tumori ale gâtului, mielom multiplu, limfom malign, policitemie adevărată, leucemie, gușă, cancer pelvian, tumoare ureterală, tumoare a vezicii urinare, cancer al vezicii biliare, cancer al ductului biliar, melanom malign, și tumoare pediatrică, tumoarea pediatrică menționată fiind selectată dintre sarcom Ewing, tumoare Wilms, rabdomiosarcom, sarcom vascular, cancer testicular embrionar, neuroblastom, retinoblastom, hepatoblastom, și nefroblastom.

Avantajul noului compus cu formula 1 este solubilitatea mai mare în medii organice, ceea ce poate furniza o varietate mai largă de formulări adecvate, și permite o biodisponibilitate mai mare și alți parametri farmacocinetici superiori. Astfel, de exemplu, solubilitatea compusului cu formula 1 în dimetil sulfoxid este cu mai mult de două ori mai mare decât cea a trametinib. Solubilitatea într-un amestec de 4 % dimetil sulfoxid și 96 % ulei vegetal este mai mare de asemenea. Solubilitatea compusului cu formula 1 în diferite medii comparativ cu cea a trametinib este dată în tabelul 1.

Tabelul 1. Solubilitatea compusului cu formula 1 și a trametinib în diferite medii

Compus	Solubilitatea în apă (mg/mL)	Solubilitatea în dimetil sulfoxid (mg/mL)	Solubilitatea în un amestec de 4 % dimetil sulfoxid și 96 % ulei de porumb (mg/mL)
Compus cu formula 1	< 1	47	7
Trametinib	< 1	22	3

Activitatea inhibitoare a noului compus cu formula 1 este comparabilă cu activitatea inhibitoare a trametinib în ceea ce privește MEK1, valoarea experimentală fiind $IC_{50} = 8,02$ nM ($IC_{50} = 8,14$ nM pentru trametinib).

O toxicitate a cursului de doză semnificativ mai mică comparativ cu a prototipului (mekinist, complexul cu dimetil sulfoxid al trametinib) este avantajul absolut al noului compus cu formula 1. Studii de eficacitate asupra modelului de xenogrefă de melanom uman a arătat că compusul cu formula 1 inhibă creșterea tumorii și produce regresul tumorii în manieră dependentă de doză. Eficiența compusului cu formula 1 este comparabilă cu cea a mekinist, compusul cu formula 1 fiind mai puțin toxic: tratamentul experimental cu mekinist a avut ca rezultat o pierdere de greutate critică și moartea a două animale, în timp ce compusul cu formula 1 nu a cauzat moartea unor animale nici chiar la doze mai mari.

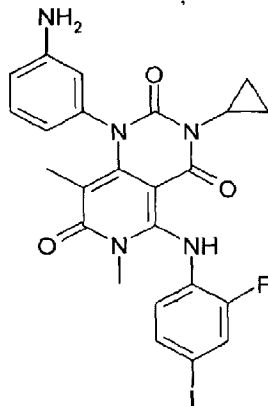
Studiul activității antitumorale a compusului cu formula 1 față de cea a Mekinist a fost executat pe șoareci femelă nuzi NMRI. După formarea tumorilor, animalele au fost subdivizate în grupe, astfel încât mărimea medie a tumorii din grup a fost $\sim 150 \text{ mm}^3$. Animalele au fost tratate cu producții de testat timp de 21 de zile. Greutatea animalelor din grupele experimentale care au primit compusul cu formula 1 în doze până la, și incluzând, 3 mg/kg, nu a fost semnificativ diferită de cea a animalelor din grupa martor (Fig. 1). Tratamentul cu o doză de 10 mg/kg de compus cu formula 1 a avut ca rezultat pierdere de greutate a corpului animalului, care a fost observată pe întreaga durată a studiului de la prima administrare, dar nu a fost mai mare de 20% comparativ cu data de începere a tratamentului. Cu toate acestea, administrarea intragastrică a 3 mg/kg de mekinist timp de 9 zile a avut ca rezultat o pierdere de greutate critică și moartea a două animale, ceea ce a cauzat necesitatea de a opri tratamentul în această grupă timp de trei zile pentru a reface greutatea.

Dinamica creșterii tumorii este prezentată în Fig. 2. Administrarea intragastrică a 0,3 mg/kg de compus cu formula 1 nu a avut efect asupra creșterii tumorii, în timp ce o inhibiție semnificativă a creșterii tumorii a fost observată în toate celelalte grupe. De asemenea, a fost observată regresia tumorii la trei dintre cele opt animale care au primit 1 mg/kg compus cu formula 1, și la 7/8 și 8/8 animale care au primit 3 și 10 mg/kg compus cu formula 1, în mod corespunzător. Administrarea intragastrică a 3 mg/kg de mekinist a produs regresul la 100 % dintre animalele din grupă, de asemenea.

Astfel, compusul cu formula 1 a prezentat inhibiție și regresie a tumorii dependentă de doză, nu a produs moartea vreunui animal, și a redus moderat greutatea animalelor doar la doza maxim studiată.

Compusul cu formula 1 fiind inhibitor al MEK1, MEK2 și MEK1/2, este utilizat de preferință pentru tratamentul cancerului, incluzând melanoamele maligne la pacient.

Subiectul acestei invenții este de asemenea o metodă de a produce compusul cu formula 1, care constă în interacțiunea dintre 1-(3-aminofenil)-3-ciclopropil-5-[(2-fluoro-4-iodofenil)amino]-6,8-dimetilpirido[4,3-d]pirimidin-2,4,7(1H,3H,6H)-trionă cu formula 2 sau sarea acesteia cu acidul ciclopropilcarboxilic sau derivatul activat al acestuia (de ex., cloranhidrida sau esterul activat respectiv sau anhidrida activată respectivă a acestui acid) într-un solvent, de ex., CH_2Cl_2 , tetrahidrofuran, N,N-dimetilformamidă, N,N-dimetilacetamidă sau N-metilpirolidonă, cu obținerea suplimentară a unui solvat cristalin al produsului final prin răcirea lentă a unei soluții saturate fierbinți în dimetil sulfoxid.



Subiectul acestei invenții este o compoziție farmaceutică care conține o cantitate terapeutică eficientă de compus cu formula 1 ca ingredient activ, și excipienți farmaceutici acceptabili pentru utilizare în profilaxia și tratamentul unui cancer asociat cu MEK1, MEK2 și MEK1/2, cancerul menționat fiind selectat dintre tumoare cerebrală, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de ficat, cancer pancreatic, cancer colorectal, cancer de plămâni, cancer renal, cancer mamar, cancer ovarian, cancer de prostată, cancer cutanat, neuroblastom, sarcom, osteocondrom, osteom, osteosarcom, seminom, tumori extragonadale, tumoare testiculară, cancer uterin, cancer al capului și tumori ale gâtului, mielom multiplu, limfom malign, policitemie adevărată, leucemie, gușă, cancer pelvian, tumoare ureterală, tumoare a vezicii urinare, cancer al vezicii biliare, cancer al ductului biliar, melanom malign, și tumoare pediatrică, tumoarea pediatrică menționată fiind selectată dintre sarcom Ewing, tumoare Wilms, rabdomiosarcom, sarcom vascular, cancer testicular embrionar, neuroblastom, retinoblastom, hepatoblastom, și nefroblastom.

Compoziția farmaceutică poate fi utilizată în profilaxia și/sau tratamentul melanoamelor maligne.

Compoziția farmaceutică se poate afla sub formă adecvată pentru uz oral (de ex., comprimate, pastile, capsule tari sau moi, suspensii apoase sau uleioase, emulsii, pulberi sau granule dispersabile, siropuri sau elixiruri), pentru uz topic (de ex., creme, unguente, geluri, soluții sau suspensii apoase sau

uleioase), pentru inhalații (de ex., pulbere fină sau aerosol lichid), pentru insuflare (de ex., pulbere fină), injecții de doză subcutanate sau intramusculare, sau supozitoare pentru administrare rectală).

Compoziția farmaceutică poate fi obținută prin metode uzuale, prin amestecarea unei cantități terapeutice eficiente de compus cu formula 1 cu excipienți farmaceutici convenționali bine cunoscuți. Astfel, compoziția farmaceutică destinată pentru administrare orală poate conține, de ex., unul sau mai mulți coloranți, îndulcitori, arome și/sau conservanți.

De obicei, compușii cu formula 1 sunt administrați la pacient sub formă de doză unică, de 5 - 5000 mg/m² de suprafață a corpului, adică aproximativ 0,1 - 100 mg/kg, care furnizează în general o doză terapeutică eficientă. De obicei, forme dozate unice, cum ar fi comprimat sau capsulă, conțin, de ex., 1 - 250 mg de ingredient activ. Doza zilnică variază întotdeauna, depinzând de pacient, de calea de administrare specifică și de severitatea tulburării sub tratament. De aceea, medicul, care execută tratamentul pacientului specific, poate determina o doză optimă. În această descriere, termenul „terapie” include „profilaxie”.

Tipurile de cancer, care pot fi susceptibile la tratamentul utilizând compusul cu formula 1 sau sărurile și/sau solvații farmaceutice acceptabile ai acestuia, includ, fără limitare, melanoamele maligne.

Subiectul invenției de față este de asemenea un medicament incluzând o cantitate terapeutică eficientă de compus cu formula 1, pentru utilizare în profilaxia și tratamentul unui cancer asociat cu MEK1, MEK2 și MEK1/2, cancerul menționat fiind selectat dintre tumoare cerebrală, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de ficat, cancer pancreatic, cancer colorectal, cancer de plămâni, cancer renal, cancer mamar, cancer ovarian, cancer de prostată, cancer cutanat, neuroblastom, sarcom, osteocondrom, osteom, osteosarcom, seminom, tumori extragonadale, tumoare testiculară, cancer uterin, cancer al capului și tumori ale gâtului, mielom multiplu, limfom malign, policitemie adevărată, leucemie, gușă, cancer pelvian, tumoare ureterală, tumoare a vezicii urinare, cancer al vezicii biliare, cancer al ductului biliar, melanom malign, și tumoare pediatrică, tumoarea pediatrică menționată fiind selectată dintre sarcom Ewing, tumoare Wilms, rabdomiosarcom, sarcom vascular, cancer testicular embrionar, neuroblastom, retinoblastom, hepatoblastom, și nefroblastom.

În conformitate cu un alt aspect al acestei invenții, compusul cu formula 1 se propune să fie utilizat, așa cum a fost definit mai sus, pentru prepararea unei compoziții farmaceutice tratamentul cancerului prin amestecarea unei cantități terapeutice eficiente de compus cu formula 1 cu excipienți farmaceutici acceptabili.

Un efect anti-cancer la un pacient care are nevoie de un asemenea tratament a fost de asemenea propus prin administrarea unei cantități eficiente a compusului cu formula 1 la pacient.

Nu un aspect al acestei invenții este o metodă pentru tratamentul unei persoane care suferă de o boală în care inhibiția MEK1/2 este utilă, a fost de asemenea propus; metoda include etapele de administrare a unei cantități eficiente de compus cu formula 1 la un pacient care are nevoie de un asemenea tratament. În special, boala în care inhibiția MEK1, MEK2 și MEK1/2 este utilă este cancerul.

În oricare dintre aspectele sau versiunile menționate aici, unde cancerul este indicat în sens general, cancerul menționat poate fi selectat dintre tumoare cerebrală (neurogliom cu o componentă de astrogliom malign și oligodendrogliome, etc.), cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de ficat, cancer pancreatic, cancer colorectal (cancer de colon, cancer rectal, etc.), cancer de plămâni (cancer de plămâni cu celule non mici, cancer de plămâni cu celule mici, cancer primar și metastatic cu celule scvamatoase, etc.), cancer renal, cancer mamar, cancer ovarian, cancer de prostată, cancer cutanat, neuroblastom, sarcom, osteocondrom, osteom, osteosarcom, seminom, tumori extragonadale, tumoare testiculară, cancer uterin (cancer cervical, cancer endometrial, etc.), cancer al capului și tumori ale gâtului (cancer al sinusului maxilar, cancer laringian, cancer faringian, cancer al limbii, cancer intraoral, etc.), mielom multiplu, limfom malign (reticulosarcom, limfosarcom, boală Hodgkin, etc.), policitemie adevărată, leucemie (leucemie mieloidă acută, leucemie mieloidă cronică, leucemie acută, leucemie limfocitară, leucemie limfocitară cronică, etc.), gușă, cancer pelvian, tumoare ureterală, tumoare a vezicii urinare, cancer al vezicii biliare, cancer al ductului biliar, melanom malign, tumoare pediatrică (sarcom Ewing, tumoare Wilms, rabdomiosarcom, sarcom vascular, cancer testicular embrionar, neuroblastom, retinoblastom, hepatoblastom, nefroblastom, etc.) și altele asemenea.

Tratamentul bolilor canceroase descrise mai sus poate fi utilizat ca monoterapie, sau poate include intervenție chirurgicală generală sau terapie cu radiații, sau chemoterapie, sau imunoterapie adițional față de compusul în conformitate cu această invenție. Această chemoterapie poate fi introdusă simultan, succesiv sau separat, și poate include adițional unul sau mai mulți agenți antitumorali din următoarele categorii: medicamente antiproliferative/anticancer și combinațiile acestora utilizate în oncologia medicală; agenți citostatici; agenți anti-invasie; inhibitori ai factorilor de creștere; agenți antiangiogenici; agenți vasculari; antagoniști ai receptorilor endotelinei vătămați; terapii antisens; abordări de terapie genică; și abordări de imunoterapie (J).

Astfel, această invenție propune o compoziție farmaceutică incluzând compusul cu formula 1 și o substanță antitumorală adițională, așa cum a fost definită mai sus, pentru utilizare în tratamentul concomitent al cancerului.

5 Această invenție propune o compoziție farmaceutică incluzând compusul cu formula 1, și o substanță antitumorală adițională, așa cum a fost definită mai sus, pentru utilizare în tratamentul combinat al cancerului.

Termenul "tratament concomitent" utilizat în relație cu terapia combinată ar trebui citit ca administrare simultană, separată sau succesivă.

10 Invenția propune utilizarea compusului cu formula 1 și unei substanțe antitumorale adiționale, pentru utilizare în tratamentul concomitent al cancerului.

Această invenție este sprijinită de desene.

Fig. 1. Dinamica schimbării greutateii corpului animal în timpul tratamentului cu medicamentele de studiu.

Fig. 2. Dinamica creșterii tumorii de melanom uman A375 într-un model de xenogrefă în timpul tratamentului cu mekinist și cu compusul cu formula 1.

15 Cea mai bună implementare a invenției

Această invenție va fi descrisă mai în detaliu utilizând exemple specifice. Următoarele exemple sunt furnizate ca ilustrare, și nu sunt destinate pentru a limita invenția. Experții din acest domeniu pot înțelege diferiți parametri necritici, care pot fi schimbați sau modificați pentru a da în mod esențial aceleași rezultate.

20 **Exemplul 1.** Metodă de preparare a N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanecarboxamidei solvat de dimetil sulfoxid.

Se adaugă clorură de ciclopropilcarbonil (182 mg, 1,74 mmoli) la o soluție de 1-(3-aminofenil)-3-ciclopropil-5-{(2-fluoro-4-iodofenil)amino}-6,8-dimetilpirido[4,3-d]pirimidine-2,4,7-(1H,3H,6H)-trionă cu formula 2 (500 mg, 0,87 mmoli) și diizopropiletilamină (225 mg, 1,74 mmoli) în 5 mL de dimetilformamidă la temperatura mediului, și se amestecă masa de reacție peste noapte. După terminarea reacției, se evaporă solventul sub vid, se dizolvă restul în 5 mL de diclormetan și se spală succesiv cu soluție apoasă saturată de hidrogen carbonat de sodiu, și soluție apoasă saturată de clorură de sodiu. Se separă stratul organic și se usucă pe sulfat de sodiu anhidru peste noapte, se filtrează și se evaporă filtratul sub vid. Se izolează produsul prin flash cromatografie pe silicagel, utilizând diclormetan și un amestec de diclormetan și acetat de etil (1:1) ca efluent. Se dizolvă produsul brut (250 mg) în 1,3 mL de dimetil sulfoxid la 70 °C și se amestecă soluția timp de o oră, apoi se răcește la temperatura mediului și se amestecă peste noapte. Se filtrează precipitatul, se spală cu diclormetan pe filtru și se usucă sub vid înalt la 40 - 50 °C timp de 2 ore. Se obține N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanecarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid (130 mg, 48 %) sub formă de pulbere albă cristalină.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): 0,79 (m, 2H), 0,86 (m, 2H), 1,05 - 1,15 (m, 4H), 1,44 (s, 3H), 1,5 (m, 1H), 2,62 (s, 6H), 2,74 (m, 1H), 3,21 (s, 3H), 6,7 (t, 1H), 7,03 (m, 1H), 7,31 - 7,4 (m, 2H), 7,45 (d, 1H), 7,53 (d, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 11,3 (s, 1H).

40 **Exemplul 2.** Determinarea solubilității termodinamice a compusului cu formula 1 și a prototipului trametinib. Se amestecă 5 mg de compus de studiat cu 1 mL de tampon universal (Pion Ltd), pH = 2,0; 4,0 sau 7,0 timp de 15 min la 25 °C. Se utilizează cantități adiționale de substanțe, până când soluția devine tulbure. Se incubează flacoanele cu soluție timp de 24 de ore la 25 °C cu amestecare, pentru a obține echilibrul între soluția saturată și precipitat. După echilibrare, se filtrează 200 μL de soluție (în duplicat) pe o placă de filtru cu 96 de godeuri (Millipore) pentru a separa precipitatul. Se determină concentrațiile compușilor din filtrat prin spectrofotometrie, utilizând o curbă de calibrare standard. Se execută măsurarea spectrului de absorbție optică a substanței și se reprezintă grafic curba de calibrare la lungimea de undă selectată (de obicei corespunzând la maximum de absorbție a substanței λ_{max}). Se calculează concentrația substanței din filtrat (adică, solubilitatea) prin următoarea ecuație:

50 Solubilitatea = (OD_{λ_{max}} filtrat - OD_{λ_{max}} blanc)/Panta x 1,67 x diluția filtratului,

unde:

OD_{λ_{max}} filtrat = absorbanța filtratului;

OD_{λ_{max}} blanc = absorbanța soluției blanc fără substanță;

Panta = panta curbei de calibrare;

55 1,67 = factor de diluție pentru filtrat în acetonitril;

Diluția filtratului = factor de diluție pentru filtrat în tampon.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Exemplul 3. Analiza. Substanțele au fost testate pentru efectul asupra activității MEK1 kinazei utilizând platforma de depistare Z'-LYTE (Life Technologies).

Concentrația de DMSO din amestecul de reacție a fost 1 %. Se diluează 100 nL de scufundări de 100 de ori ale substanței de studiu în 100 % DMSO în 2,4 μ L de tampon de kinază (50 mM de HEPES pH 7,5, 0,01 % BRIJ-35, 10 mM de MgCl_2 , 1 mM de EGTA) și se adaugă la 5 μ L de amestec de substrat/kinază de 2 ori (MEK1 /MARK1 inactivată (ERK2)/Ser/Thr03, conținutul final 0,08 – 0,31 ng de MEK1, 105 ng de MARK1 inactivată (ERK2), și 2 μ M de Ser/Thr03) în o placă de 384 de godeuri (neagră, cu volum mic, fabricată de Corning, kaT . #3676). Se pre-incubează substanțele cu kinaze timp de 10 min la temperatura mediului. După aceea, se adaugă 2,5 μ L de soluție de ATP de 4 ori pentru a începe reacția (concentrația finală de ATP din amestecul de reacție este 100 μ M). După 30 de secunde de incubație pe un agitator, se incubează reacția timp de 60 de minute la temperatura mediului. Apoi se adaugă 5 μ L de Reactiv B (Life Technologies) diluat la 1:1024 și se incubează timp de încă 60 min la temperatura mediului. Se măsoară fluorescența cu excitație la 400 nM și emisie la 445 nM și 520 nM. Se calculează gradul de fosforilare a substratului peptidic prin ecuația de mai jos (raport de emisie mic înseamnă că peptida este fosforilată, adică activitatea kinazei nu este inhibată, și raport de emisie mare înseamnă că peptida nu este fosforilată, adică activitatea kinazei este inhibată).

Se calculează % de fosforilare astfel:

$$\left\{ 1 - \frac{(\text{raport de emisie} \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + [\text{raport de emisie} \times (F_{100\%} - F_{0\%})]} \right\} * 100,$$

Se calculează % de inhibiție astfel:

$$\left\{ 1 - \frac{\% \text{Fosf. probă}}{\% \text{Fosf. 0\% inhibiție mar.}} \right\} * 100,$$

unde: $C_{100\%}$ = semnalul mediu de emisie al cumarinei, 100 % martor de fosforilare;

$C_{0\%}$ = semnalul mediu de emisie al cumarinei, 0 % martor de fosforilare;

$F_{100\%}$ = semnalul mediu de emisie al fluoresceinei, 100 % martor de fosforilare;

$F_{0\%}$ = semnalul mediu de emisie al fluoresceinei, 0 % martor de fosforilare.

Exemplul 4. Studiul eficienței în modelul de xenogrefă de melanom uman. Studiul a fost executat în ProQinase GmbH Freiburg, Breisacher Str. 117, D-79106 Freiburg, GERMANY.

Celule de melanom uman A375 au fost cultivate în fiole cu mediu DMEM cu adăugarea a 10 % FBS în atmosferă umedă, care conține 95 % de aer și 5 % de CO_2 la 37 °C. Celulele canceroase au fost trecute la animale după o perioadă de adaptare. În acest scop, celulele au fost colectate utilizând TrypLE Express (Invitrogen), spălate și suspendate în PBS steril la concentrația finală de 3×10^7 celule/mL. Această suspensie de celule a fost injectată subcutanat (SC) în partea dreaptă a șoarecelui (3×10^6 celule sau 100 μ L pe șoarece).

Atunci când mărimea medie a tumorii a atins 100 - 200 mm^3 animalele au fost subdivizate în grupe experimentale, și tratamentul cu medicamentul de testat a fost început. Produsele au fost administrate intragastric zilnic, în timp ce grupa martor a primit solvent. Dozele de produs experimental sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Dozele de produs din studiul eficienței în modelul de xenogrefă de melanom uman

Grupa	Substanțele	Doza, mg/kg	Numărul de animale
1	Solvent	10 mL/kg	10
2	Mekinst	3,0	8
3	Compus cu formula 1	0,1	8
4	Compus cu formula 1	0,3	8
5	Compus cu formula 1	1,0	8
6	Compus cu formula 1	3,0	8
7	Compus cu formula 1	10,0	8

Parametrii cheie măsurați:

Măsurarea tumorilor implantate subcutanat a fost executată de două ori pe săptămână începând din ziua introducerii celulelor. Volumul tumorii (mm^3) a fost determinat prin ecuația:

$$V = L \times W^2/2,$$

unde L corespunde la diametrul maxim al tumorii, și W la diametrul minim al tumorii (mm). Măsurătorile au fost executate utilizând un șubler cu alunecare.

Studiul a inclus calculul valorilor de inhibiție a creșterii tumorii:

$$T/C = V_{exp}/V_{ctrl} \times 100 \%,$$

unde:

V_{ctrl} = volumul mediu al tumorii în grupa martor;

V_{exp} = volumul mediu al tumorii în grupa experimentală.

De asemenea, sănătatea și comportamentul animalelor au fost monitorizate, numărul de consecințe letale și regresii ale tumorii au fost înregistrate:

$$Regresie = (V_{ini} - V_{fin})/V_i \times 100 \%,$$

unde:

V_{ini} = volumul inițial al tumorii la începutul tratamentului;

V_{fin} = volumul tumorii la finalul tratamentului.

Măsurarea greutateii animalelor a fost executată de trei ori pe săptămână.

Tabelul 3. Parametrii de inhibiție a tumorii după 21 de zile de tratament (T/C)

Grupa	Substanțe	Doza, mg/kg	Numărul de animale	V med., mm ³	T/C, %
1	Solvent	-	8	2112,0	
2	Mekinist	3,0	6	21,1	1,0
3	Compus cu formula 1	0,3	7	834,3	39,5
4	Compus cu formula 1	1,0	7	140,5	6,7
5	Compus cu formula 1	3,0	8	84,5	4,0
6	Compus cu formula 1	10,0	8	26,1	1,2

Fig. 2 arată dinamica creșterii tumorii de melanom A375 în modelul de xenogrefă în timpul tratamentului cu mekinist și cu compusul cu formula 1.

Compusul cu formula 1 a prezentat o inhibiție a creșterii tumorii dependentă de doză și o regresie comparabile cu intensitatea efectului mekinist. Cu toate acestea, deoarece este distinct de mekinist, compusul cu formula 1 nu a cauzat morți ale animalelor la nici una dintre dozele studiate (tratamentul cu mekinist a avut ca rezultat o pierdere de greutate critică și două morți ale animalelor) și a redus doar moderat greutatea animalului la doza maximă studiată. Acest fapt presupune o toxicitate mai slabă a compusului cu formula 1 comparativ cu mekinist fără pierderea eficacității tratamentului pentru melanom.

Exemplul 5. Prepararea medicamentului în comprimate. Se amestecă 1600 mg de amidon, 1600 mg de lactoză sfărâmată, 400 mg de talc și 1000 mg de inhibitor cu formula 1, și se comprimă într-o bară. Se macină această bară în granule și se cerne, colectând granulele cu mărimea de 14 - 16. Se comprimă aceste granule în comprimate de forme adecvate (500 mg fiecare).

Exemplul 6. Prepararea medicamentului în capsule. Se amestecă inhibitorul cu formula 1 cu lactoză (2:1). Se introduce acest amestec de pulbere în capsule de gelatină de mărime adecvată (600 mg fiecare).

Exemplul 7. Prepararea medicamentului sub formă de compoziție pentru injecții intramusculare, intraperitoneale, sau subcutanate. Se amestecă 500 mg de inhibitor cu formula 1 cu 300 mg de clorbutanol, 2 mL de propilen glicol și 100 mL de apă pentru injecție. Se filtrează soluția și se introduce în fiole de 1 mL, care sunt apoi sigilate.

Aplicabilitate industrială

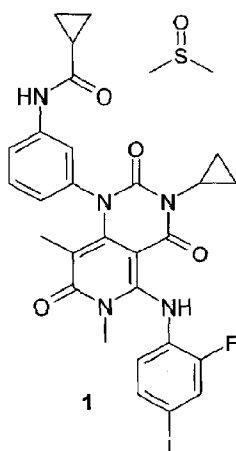
Experții în acest domeniu pot înțelege cu ușurință diferiți parametri necritici care pot fi schimbați sau modificați pentru a da aceleași rezultate. Diferite modificări ale invenției, adițional față de cele descrise aici, ar fi evidente pentru experții din acest domeniu din descrierea furnizată mai sus.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A2-2014/066606
- HYKOUK1 ABE ET AL.: 'Discovery of a Highly Potent and selective MbK Inhibitor: GSK1120212 (JTP-74057 DMSO Solvate)' ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS vol. 2, 2011, pages 320 - 324, XP055209291
- US-B2- 7 378 423

(57) Revendicări:

1. N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropancarboxamidă solvat de dimetil sulfoxid cu formula 1:



2. Compusul în conformitate cu revendicarea 1 pentru utilizare în profilaxia și/sau tratamentul unui cancer asociat cu MEK1, MEK2 și MEK1/2, cancerul menționat fiind selectat dintre tumoare cerebrală, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de ficat, cancer pancreatic, cancer colorectal, cancer de plămâni, cancer renal, cancer mamar, cancer ovarian, cancer de prostată, cancer cutanat, neuroblastom, sarcom, osteocondrom, osteom, osteosarcom, seminom, tumori extragonadale, tumoare testiculară, cancer uterin, cancer al capului și tumori ale gâtului, mielom multiplu, limfom malign, policitemie adevărată, leucemie, gușă, cancer pelvian, tumoare ureterală, tumoare a vezicii urinare, cancer al vezicii biliare, cancer al ductului biliar, melanom malign, și tumoare pediatrică, tumoarea pediatrică menționată fiind selectată dintre sarcom Ewing, tumoare Wilms, rabdomiosarcom, sarcom vascular, cancer testicular embrionar, neuroblastom, retinoblastom, hepatoblastom, și nefroblastom.

3. Compusul pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 2, în care cancerul este melanomul malign.

4. Compoziție farmaceutică care conține o cantitate terapeutic eficientă de compus în conformitate cu revendicarea 1 ca ingredient activ, și excipienți farmaceutici acceptabili pentru utilizare în profilaxia și/sau tratamentul unui cancer asociat cu MEK1, MEK2 și MEK1/2, cancerul menționat fiind selectat dintre tumoare cerebrală, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de ficat, cancer pancreatic, cancer colorectal, cancer de plămâni, cancer renal, cancer mamar, cancer ovarian, cancer de prostată, cancer cutanat, neuroblastom, sarcom, osteocondrom, osteom, osteosarcom, seminom, tumori extragonadale, tumoare testiculară, cancer uterin, cancer al capului și tumori ale gâtului, mielom multiplu, limfom malign, policitemie adevărată, leucemie, gușă, cancer pelvian, tumoare ureterală, tumoare a vezicii urinare, cancer al vezicii biliare, cancer al ductului biliar, melanom malign, și tumoare pediatrică, tumoarea pediatrică menționată fiind selectată dintre sarcom Ewing, tumoare Wilms, rabdomiosarcom, sarcom vascular, cancer testicular embrionar, neuroblastom, retinoblastom, hepatoblastom, și nefroblastom.

5. Compoziția farmaceutică pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 4, în care cancerul este melanomul malign.

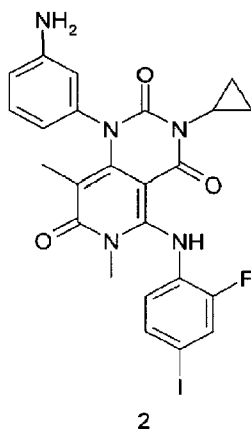
6. Compoziția farmaceutică pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 4, în care compoziția este sub formă de comprimate, capsule sau injecții.

7. Medicament cuprinzând compusul în conformitate cu revendicarea 1, pentru utilizare în profilaxia și/sau tratamentul unui cancer asociat cu MEK1, MEK2 și MEK1/2, cancerul menționat fiind selectat dintre tumoare cerebrală, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de ficat, cancer pancreatic, cancer colorectal, cancer de plămâni, cancer renal, cancer mamar, cancer ovarian, cancer de prostată, cancer cutanat, neuroblastom, sarcom, osteocondrom, osteom, osteosarcom, seminom, tumori extragonadale, tumoare testiculară, cancer uterin, cancer al capului și tumori ale gâtului, mielom multiplu, limfom malign, policitemie adevărată, leucemie, gușă, cancer pelvian, tumoare ureterală, tumoare a vezicii urinare, cancer al vezicii biliare, cancer al ductului biliar, melanom malign, și tumoare pediatrică, tumoarea pediatrică menționată fiind selectată dintre sarcom Ewing, tumoare Wilms, rabdomiosarcom, sarcom vascular, cancer testicular embrionar, neuroblastom, retinoblastom, hepatoblastom, și nefroblastom.

8. Medicamentul pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 7, în care cancerul este melanomul malign.

9. Metodă de preparare a compoziției farmaceutice în conformitate cu revendicarea 4, prin amestecarea unei cantități terapeutice eficiente de compus în conformitate cu revendicarea 1, cu excipienți farmaceutici acceptabili.

10. Metodă de preparare compusului în conformitate cu revendicarea 1, incluzând interacțiunea compusului în conformitate cu formula 2 sau a sării acestuia cu acidul ciclopropancarboxilic sau cu derivatul activat al acestuia:



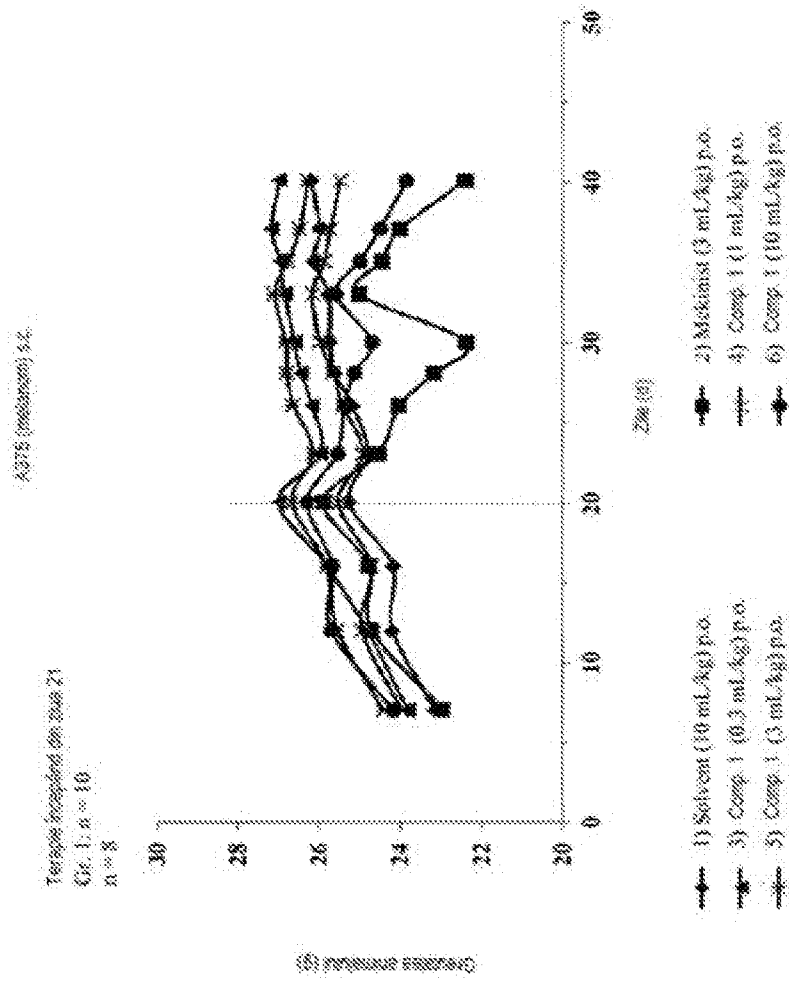


Fig. 1.

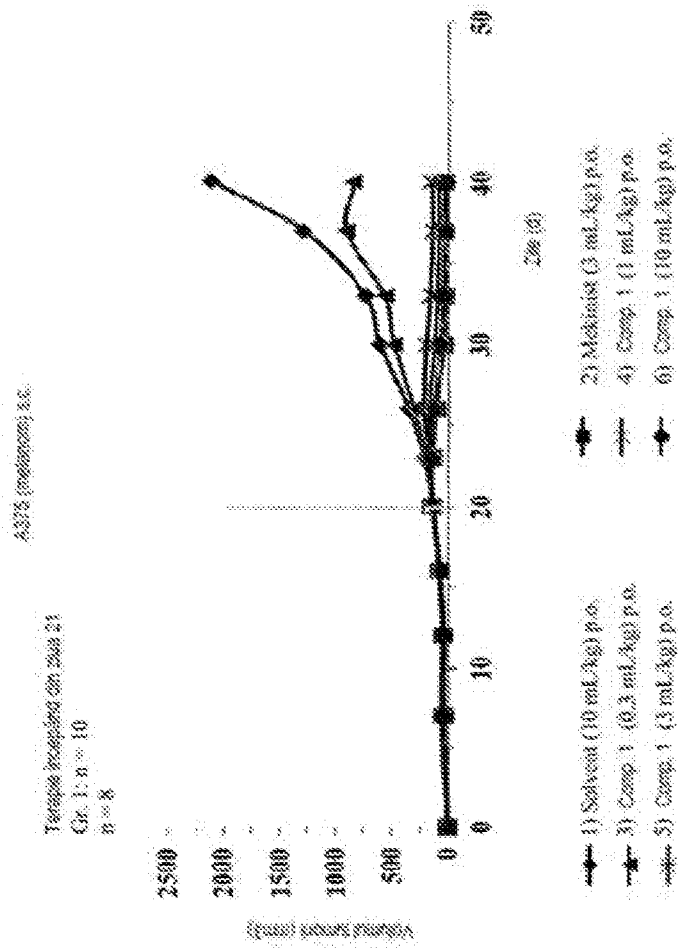


Fig. 2.