УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129244** (13) **C2**

(51) МПК (2025.01)
A61K 31/4192 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2019 11329**

(22) Дата подання заявки: **19.04.2018**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **27.02.2025**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **15/494,820, 15/899,707**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **24.04.2017, 20.02.2018**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **27.04.2020, Бюл.№ 8**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **26.02.2025, Бюл.№ 9**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/IB2018/052710, 19.04.2018**

(72) Винахідник(и):
Неллоре Кавіта (IN),
Госагаллі Субраманіа (IN)

(73) Володілець (володільці):
ОРІДЖИН ОНКОЛОДЖИ ЛІМІТЕД,
39-40, KIADB Industrial Area, Electronic City Phase II, Hosur Road, Karnataka, Bangalore 560100, India (IN)

(74) Представник:
Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367

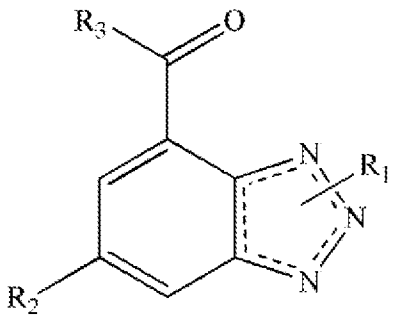
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2014/128669 A2, 28.08.2014
Recent Developments in the Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH) Inhibitors / VYAS V. K. et al. // MINI REVIEWS IN MEDICINAL CHEMI, BENTHAM SCIENCE PUBL. 2011. Vol. 11. No. 12. Pages 1039 - 1055

(54) СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ ТРИЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ БЕНЗОТРИАЗОЛУ ЯК ІНГІБІТОРІВ ДИГІДРООРОТАТОКСИГЕНАЗИ

(57) Реферат:

У даному винаході представлені способи лікування раку у суб'єкта і інгібування росту пухлини, метастазів або активності ферменту дигідрооротатоксигенази в пухлині або раковій клітині. Щонайменше одне тризаміщене похідне бензотриазолу формули (I)

UA 129244 C2



(I)

вводять суб'єкту або вводять у контакт з раковою клітиною. Сполуки формули (I) мають замісники R_1, R_2 і R_3, які мають значення, що наведені в описі, і їх фармацевтично прийнятні солі.

Перехресне посилання на спорідненні заявки

Дана заявка вимагає пріоритет заявки на патент США № 15/899,707, поданої 20 лютого 2018 р., і заявки на патент США № 15/494,820, поданої 24 квітня 2017 р. і наразі патенту США № 9,937,155, обидві з яких включені сюди за допомогою посилання у всьому об'ємі.

Область техніки

Даний винахід стосується нових тризаміщених похідних бензотриазолу формули (I), які є інгібіторами дигідрооротатдегідрогенази. Зокрема, винахід стосується нових сполук, які інгібують активність ферменту ДГОДГ, способу їх виробництва і фармацевтичних композицій, що містять їх, і їх застосування для лікування і профілактики захворювань або розладів, зокрема, їх застосування в захворюваннях або розладах, при яких переважно інгібувати ДГОДГ.

Опис рівня техніки

ДГОДГ є білком, який каталізує одну зі стадій нового біосинтетичного шляху піримідинового нуклеотиду. (Greene et al. Biochem Pharmacol 1995, 50:861-7; Davis J.P et al. FASEB J 1996, 10(6): Abst C23). Він каталізує тільки реакцію окиснення/відновлення в цьому шляху, який є стадією перетворення ДГО (дигідрооротату) в оротат за допомогою флавінового кофактору і електронного акцептору. Було виявлено, що інгібітори дигідрооротатдегідрогенази мають більш широке застосування як хіміотерапевтичні агенти. (Kensler et al. 1989 in: Design of Enzyme Inhibitors as Drugs; Sandler, M., and Smith, H. J. Eds., pp 379-401 Oxford Univ Press, Oxford England; Cody et al. Am. J. Clin. Oncol. 16, 526-528 (1993)).

Як приклад інгібіторів ДГОДГ, похідне хіноліну Бреквінар (6-фтор-2-(2'-фтор[1,1'-біфеніл]-4-іл)-3-метил-4-хінолінкарбонова кислота) демонструє протиракову активність відносно L1210 мишачого лейкозу (Andreson LW. Et al. Cancer Commun. 1989; 1(6), 381-7; Chen SF. et al. Cancer Res. 1986 Oct; 46(10): 5014-9). Також було показано, що Бреквінар посилює протиракову дію 5-фторурацилу в мишачій моделі пухлини товстої кишки 38 через тканино-специфічне модулювання уридиннуклеотидних пулів. (G Pizzorno et al. Cancer Res. 1992 Apr 1; 52:1660-5).

Інгібітори ДГОДГ також можуть застосовуватися в лікуванні медийованих вірусом захворювань (див. US 6,841,561). Більше того відомо, що інгібування ДГОДГ є багатообіцяючою мішенню для лікування відторгнення трансплантатів, ревматоїдного артриту, псоріазу, а також аутоімунних захворювань (Kovarik, J. M. et al. Expert Opin. Emerg. Drugs 2003, 8, 47; Allison, A.C. Transplantation Proc. (1993) 25(3) Suppl. 2, 8-18); Makowka, L., Immunolog Rev. (1993) 136, 51-70; Davis J.P et al. Biochemistry 1996, 35: 1270-3).

Лефлуномід, добре відомий інгібітор ДГОДГ, є синтетичним лікарським засобом, що продається в даний час, низькомолекулярним лікарським засобом класу ізоксазолу (див. EP0527736, JP1993506425, JP1999322700, JP1999343285, US5494911, US5532259, WO19991017748) і який застосовується в лікуванні ревматоїдного артриту, а також який ціниться для застосування в лікуванні запальної хвороби кишечнику і хронічного відторгнення алотрансплантату.

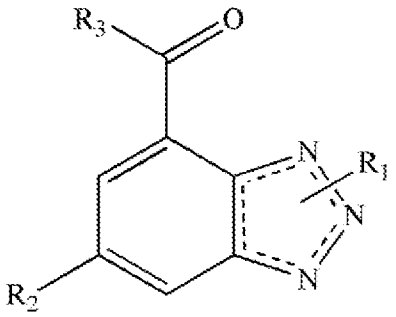
In vivo, Лефлуномід швидко перетворюється в його активний метаболіт Теріфлуномід, який надає протизапальну, антипроліферативну і імунодепресивну дію через механізми, які не є повністю зрозумілими. Терифлуномід є не тільки потенційним інгібітором протеїнтирозинкінази in vivo, але в 100-1000 раз більш сильним інгібітором ДГОДГ (Davis J.P et al. FASEB J 1996, 10(6): Abst C23; Davis J.P et al. Biochemistry 1996, 35:1270-3).

З ростом кількості пацієнтів, що страждають на аутоімунні і супутні захворювання, існує незадоволена потреба в нових ліках, які можуть більш ефективно лікувати такі захворювання. Як і раніше існує гостра потреба в імунодепресантах, які також корисні при широкій різноманітності аутоімунних і хронічних запальних захворювань, включаючи системний червоний вовчак, хронічний ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, цукровий діабет I типу, запальні захворювання кишечнику, біліарний цироз печінки, увеїт і інші розлади, такі як хвороба Крона, виразковий коліт, бульозний пемфігоїд, саркоїдоз, псоріаз, аутоімунний міозит, гранулематоз Вегенера, іхтіоз, офтальмопатію Грейвса, атопічний дерматит і астму. Вони також можуть застосовуватися як частина хіміотерапевтичних схем лікування раків, лімфом і лейкозу, окремо або в поєднанні з протипухлинними сполуками, добре відомими фахівцеві в даній галузі.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується способу лікування раку у суб'єкта, що потребує такого лікування. У одному варіанті, рак вибирають з гострого мієлоїдного лейкозу, множинної мієломи, В-пролімфоцитарного лейкозу, гострого лімфобластного лейкозу, хронічного лімфолейкозу, хвороби Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, фолікулярної лімфоми, дифузної В-великоклітинної лімфоми, анапластичної великоклітинної лімфоми, мантійно-клітинної

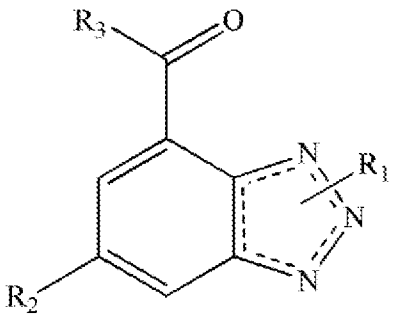
лімфоми, раку легенів, раку молочної залози, тричі негативного раку молочної залози, меланоми, гліобластоми, раку простати, раку товстої кишки, раку підшлункової залози, раку кістки, раку голови або шиї, раку шкіри, шкірного або внутрішньоочного злоякісного ендотермію, карциноми шийки матки, карциноми піхви, карциноми вульви, раку стравоходу, раку тонкої кишки, раку ендокринної системи, раку щитовидної залози, раку паращитовидної залози, раку надниркової залози, саркоми м'яких тканин, раку сечовивідного каналу, раку статевого члена, солідних пухлин дитячого віку, лімфоцитарної лімфоми сечового міхура, раку нирки або сечоводу, карциноми ниркової миски, новоутворення центральної нервової системи (ЦНС), первинної лімфоми ЦНС, ангіогенезу пухлини, пухлини хребта, гліоми стовбура мозку, аденоми гіпофізу, саркоми Капоші, епідермоїдного раку, раку пласких клітин, Т-клітинної лімфоми, раку, викликаного навколишнім середовищем і раку мутанта PTEN. У іншому варіанті, рак вибирають з гострого мієлоїдного лейкозу, множинної мієломи, В-пролімфоцитарного лейкозу, неходжкінської лімфоми, дифузної В-клітинної лімфоми, анапластичної великоклітинної лімфоми, мантійноклітинної лімфоми, тричі негативного раку молочної залози, меланоми, раку простати і раку стравоходу. Спосіб включає стадію введення суб'єкту один або більше разів терапевтично ефективної кількості щонайменше однієї сполуки формули (I):



(I)

або її фармацевтично прийнятної солі. У структурі пунктирні лінії [----] в кільці можуть представляти необов'язковий зв'язок, який може бути присутнім в будь-якому стабільному поєднанні. R_1 може бути воднем і алкілом. R_2 може бути -A-R_4. A може бути ариленом або тетразаміщеним ариленом, де замісником є галоген. R_3 може бути гідрокси і аміно. R_4 може бути необов'язково заміщеним арилом і необов'язково заміщеним гетероарилом. Необов'язковими замісниками можуть бути один або більше за R_5. R_5 може бути алкілом і -$(CH_2)_nN(R_a)R_b$. R_a і R_b незалежно може бути воднем, алкілом і -C(O)алкілом або, альтернативно, R_a і R_b можуть бути взяті разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, з отриманням необов'язково заміщеного 4-6-членного гетероциклілу, що містить 0-2 додаткові гетероатоми, незалежно вибрані з O і N, де необов'язковим замісником є алкіл, і 'n' може бути цілим числом 0 і 1.

Даний винахід також стосується способу інгібування росту і/або метастазів пухлинних клітин у суб'єкта. Спосіб включає стадію введення суб'єкту один або більше разів терапевтично ефективної кількості щонайменше однієї сполуки формули (I):

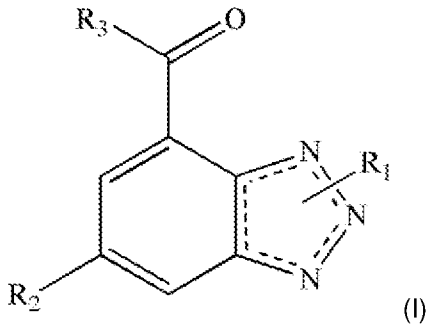


(I)

або її фармацевтично прийнятної солі. У структурі пунктирні лінії [----] в кільці можуть представляти необов'язковий зв'язок, який може бути присутнім в будь-якому стабільному поєднанні. R_1 може бути воднем і алкілом. R_2 може бути -A-R_4. A може бути ариленом або тетразаміщеним ариленом, де замісником є галоген. R_3 може бути гідрокси і аміно. R_4 може бути необов'язково заміщеним арилом і необов'язково заміщеним гетероарилом.

Необов'язковими замісниками можуть бути один або більше за R_5. R_5 може бути алкілом і -$(CH_2)_nN(R_a)R_b$. R_a і R_b незалежно може бути воднем, алкілом і -C(O)алкілом або, альтернативно, R_a і R_b можуть бути взяті разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, з отриманням необов'язково заміщеного 4-6-членного гетероциклілу, що містить 0-2 додаткові гетероатоми, незалежно вибрані з O і N, де необов'язковим замісником є алкіл, і 'n' може бути цілим числом 0 і 1.

Даний винахід також стосується способу інгібування активності ферменту дигідрооротатоксигенази в пухлинній клітині. Спосіб включає стадію контакту пухлинної клітини один або більше разів з терапевтично ефективною кількістю щонайменше однієї сполуки формули (I):



(I)

або її фармацевтично прийнятної солі. У структурі пунктирні лінії [----] в кільці можуть представляти необов'язковий зв'язок, який може бути присутнім в будь-якому стабільному поєднанні. R_1 може бути воднем і алкілом. R_2 може бути -A-R_4. A може бути ариленом або тетразаміщеним ариленом, де замісником є галоген. R_3 може бути гідрокси і аміно. R_4 може бути необов'язково заміщеним арилом і необов'язково заміщеним гетероарилом. Необов'язковими замісниками можуть бути один або більше за R_5. R_5 може бути алкілом і -$(CH_2)_nN(R_a)R_b$. R_a і R_b незалежно може бути воднем, алкілом і -C(O)алкілом або, альтернативно, R_a і R_b можуть бути взяті разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, з отриманням необов'язково заміщеного 4-6-членного гетероциклілу, що містить 0-2 додаткові гетероатоми, незалежно вибрані з O і N, де необов'язковим замісником є алкіл, і 'n' може бути цілим числом 0 і 1.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На фіг. 1 показана чутливість панелі ~400 людських ракових колоній гемопоетичного і не гемопоетичного походження до інгібування росту сполукою 1 відповідно до даного винаходу. Сірі кола представляють колонії клітин, оцінені як чутливі (демонструють ≥75% максимального інгібування росту і значення GI_{50} <1,5 мкМ).

На фіг. 2 показана чутливість додаткової панелі колоній раку людини клітинної лінії гема до інгібування росту сполукою 1 відповідно до даного винаходу.

На фіг. 3 показана здатність фізіологічних (5 мкМ) і супрафізіологічних (25 мкМ, 100 мкМ) концентрацій екзогенного уридину відновлювати цитотоксичну дію 10 мкМ сполуки на вказані колонії раку.

На фіг. 4A показані профілі чутливості відносної швидкості росту до концентрації для колоній клітин MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo і WSU-DLCL2 відносно змінюваних концентрацій сполуки 1.

На фіг. 4B показані профілі чутливості відносної швидкості росту до концентрації для колоній клітин MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo і WSU-DLCL2 відносно змінюваних концентрацій цитарабіну.

На фіг. 4C показані профілі чутливості відносної швидкості росту до концентрації для колоній клітин MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo і WSU-DLCL2 відносно змінюваних концентрацій доксорубіцину.

На фіг. 5A показані криві росту пухлини MOLM-13 у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) і лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС, виміряні протягом 14 днів.

На фіг. 5B показані фармакокінетичні профілі сполукою 1 (доза=100 мг/кг, ДРС) в плазмі мишей CB17 SCID і в імплантованих пухлинах MOLM-13 у вказані моменти часу після останньої дози в кінці дослідження.

На фіг. 5C показані рівні ДГО в не лікованих (носій) пухлинах MOLM-13 і пухлинах, лікованих сполукою 1, виміряні протягом 12 годин після останньої дози в кінці дослідження.

На фіг. 5D показані рівні уридину в не лікованих (носій) пухлинах MOLM-13 і пухлинах,

лікованих сполукою 1, виміряні протягом 12 годин після останньої дози в кінці дослідження.

На фіг. 6A показані отримані у пацієнта криві росту пухлини AML_1 у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС.

На фіг. 6B показані отримані у пацієнта криві росту пухлини AML_2 у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС.

На фіг. 6C показані отримані у пацієнта криві росту пухлини AML_3 у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС.

На фіг. 6D показані отримані у пацієнта криві росту пухлини AML_4 у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС.

На фіг. 6E показані отримані у пацієнта криві росту пухлини AML_5 у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС.

На фіг. 7A показані отримані у пацієнта криві росту пухлини ДДВВКЛ_1 (модель потрійного удару) у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС.

На фіг. 7B показані отримані у пацієнта криві росту пухлини ДДВВКЛ_2 у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 100 мг/кг сполукою 1, ДРС.

На фіг. 8 представлена крива, що показує відносну швидкість росту OCILY18, SC-1 і CARNAVAL колоній клітин двоударної дифузної B-великоклітинної лімфоми (ДДВВКЛ), оброблених різними концентраціями сполуки 1 протягом 96 годин.

На фіг. 9A показані криві росту пухлини OCILY-19 двоударної дифузної B-великоклітинної лімфоми (ДДВВКЛ) у мишей CB17 SCID, не лікованих (носій) або лікованих 10 мг/кг сполуки 1, ДРС; 30 мг/кг сполуки 1, ДРС; 100 мг/кг сполуки 1, ДРС; і 200 мг/кг сполуки 1, ОРС, всі виміряні протягом 14 днів.

На фіг. 9B показані фармакокінетичні профілі сполуки 1, введеної в дозах, описаних для фіг. 9A, в плазмі мишей CB17 SCID, у вказані моменти часу після останньої дози в кінці дослідження.

На фіг. 9C показані рівні ДГО в не лікованих (носій) пухлинах OCILY-19 і пухлинах, лікованих сполукою 1 у вказаних дозах, виміряних протягом 12 годин після останньої дози в кінці дослідження.

На фіг. 9D показані рівні уридину в не лікованих (носій) пухлинах OCILY-19 і пухлинах, лікованих сполукою 1 у вказаних дозах, виміряних протягом 12 годин після останньої дози в кінці дослідження.

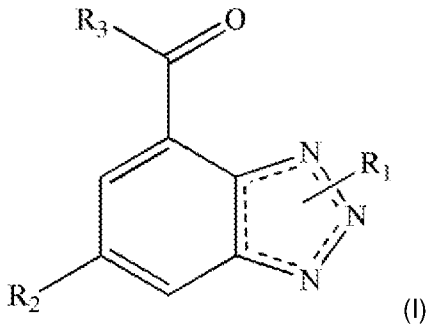
На фіг. 10 показана крива відносної швидкості росту колонії DU4475 тричі негативного раку молочної залози, лікованого різними концентраціями сполукою 1 протягом 96 годин.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У одному варіанті, даний винахід стосується тризаміщених похідних бензотриазолу як інгібіторів дигідрооротатоксигенази.

Ці похідні застосовують як лікарський засіб при лікуванні аутоімунних і запальних розладів, таких як розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, і захворювань, таких як рак.

У конкретному варіанті, у винаході представлені сполуки формули (I),



(I)

або їх фармацевтично прийнятна сіль або фармацевтично прийнятний регіоізомер,

де;

пунктирні лінії [----] в кільці можуть представляти необов'язковий зв'язок, який може бути присутнім в будь-якому стабільному поєднанні;

R_1 вибирають з водню і алкілу;

R_2 є -A-R_4;

A є ариленом або тетразаміщеним ариленом; де замісником є галоген;

R_3 вибирають з гідрокси і аміно;

R_4 вибирають з необов'язково заміщеного арилу і необов'язково заміщеного гетероарилу;

де необов'язкові замісники вибирають з одного або більше R_5;

R_5 вибирають з алкілу і $-(CH_2)_nN(R_a)R_b$;

R_a і R_b незалежно вибирають з водню, алкілу і -C(O)алкілу;

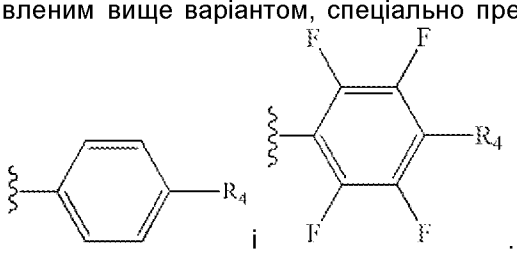
альтернативно, R_a і R_b можуть бути взяті разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, з отриманням необов'язково заміщеного 4-6-членного гетероциклілу, що містить 0-2 додаткові гетероатоми, незалежно вибрані з O і N; де необов'язковим замісником є алкіл; і

'n' є цілим числом, вибраним з 0 і 1.

Варіанти нижче є ілюстративними для даного винаходу і не обмежують формулу винаходу визначеними представленими прикладами.

Згідно з одним варіантом, спеціально представлені сполуки формули (I), в яких R_1 є алкілом; зокрема, алкіл є метилом.

Згідно з іншим варіантом, спеціально представлені сполуки формули (I), в яких R_2 є $-A-R_4$; де -A- вибирають з арилену і тетразаміщеного арилену.

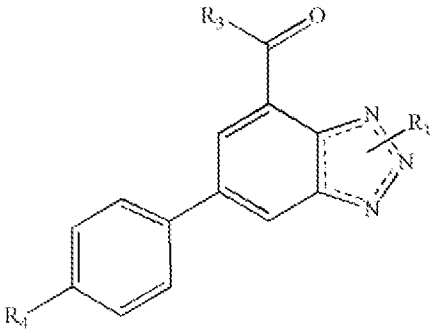
Згідно з представленим вище варіантом, спеціально представлені сполуки формули (I), в яких R_2 вибирають з  і .

Згідно з одним з представлених вище варіантів, спеціально представлені сполуки формули (I), в яких R_4 вибирають з необов'язково заміщеного фенілу; де необов'язкові замісники вибирають з метилу, ацетиламіно, ізопропіламінометилу, метиламінометилу, диметиламінометилу,

Згідно з одним з представлених вище варіантів, спеціально представлені сполуки формули (I), в яких R_4 вибирають з 2,5-диметил-1H-піролу;

Згідно з іще одним варіантом, спеціально представлені сполуки формули (I), в яких R_3 є -OH і $-NH_2$.

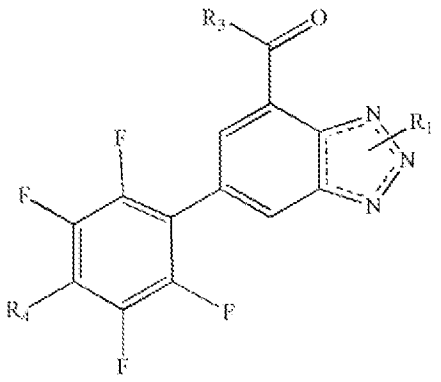
Згідно з ще одним конкретним варіантом, сполука формули (I) є сполукою формули (Ia)



(Ia),

де пунктирна лінія [---], R_1, R_3 і R_4 такі, як описані в формулі (I).

Згідно з ще одним конкретним варіантом, сполукою формули (I) є сполука формули (Ib)



(Ib),

де пунктирна лінія [---], R_1, R_3 і R_4 такі, як описані в формулі (I).

У іншому варіанті даного винаходу, представлений спосіб отримання тризаміщених похідних бензотриазолу формули (I).

Методика для сполук формули (I) детально описана нижче в покроковому описі, включаючи загальний синтез різних проміжних сполук, що беруть участь в процесі виробництва сполук відповідно до даного винаходу.

Більш конкретно, у винаході представлено застосування сполук формули (I) або їх фармацевтично прийнятної солі або регіоізомеру, включаючи їх суміші у всіх співвідношеннях, як лікарського засобу, через інгібування активності ферменту дигідрооротатоксигенази при лікуванні такого розладу, як розсіяний склероз, і інших захворювань, таких як запальні захворювання, ревматоїдний артрит і рак.

Тризаміщені похідні бензотриазолу формули (I) відповідно до даного винаходу мають терапевтичну властивість інгібування ферменту дигідрооротатдегідрогенази (ДГОДГ або ДГОД). Сполуки формули (I) можуть бути корисні для лікування і/або профілактики, без обмежень, аутоімунних і хронічних запальних захворювань, включаючи системний червоний вовчак, хронічний ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, цукровий діабет I типу, запальні захворювання кишечнику, біліарний цироз, увеїт і інші розлади, такі як хвороба Крона, виразковий коліт, бульозний пемфігоїд, саркоїдоз, псоріаз, аутоімунний міозит, міозит, аутоімунний міозит, офтальмопатія Грейвса, атопічний дерматит і астма. Сполуки формули (I) і споріднених формул також можуть застосовуватися як частина хіміотерапевтичних схем для лікування раків, лімфом і лейкозу, окремо або в поєднанні з класичними протипухлинними сполуками, добре відомими фахівцеві в даній галузі техніки.

Не обмежуючи об'єм даного винаходу, наступні визначення надані, щоб допомогти фахівцям в даній галузі техніки в розумінні детального опису заявленого винаходу.

«Алкіл» стосується вуглеводневого ланцюга, який може бути лінійним або розгалуженим ланцюгом, що містить вказане число атомів вуглецю, наприклад, C_1-C_6 алкільна група може містити від 1 до 6 (включно) атомів вуглецю. Приклади C_1-C_4 і C_1-C_6 алкільних груп включають, але не обмежуються ними, метил, етил, пропіл, бутил, пентил, гексил, ізопропіл, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, ізопентил, неопентил і ізогексил. Алкільна група може бути незаміщеною або заміщеною однією або декількома прийнятними групами.

«Аміно» стосується -N- групи, причому атом азоту вказаної групи приєднаний до водню, алкілу, циклоалкілу, арилу, гетероциклілу або будь-яким прийнятним групам. Типові приклади аміногрупи включають, але не обмежуються ними, $-NH_2$, $-NHCH_3$ і -NH-циклопропіл. Аміногрупа може бути незаміщеною або заміщеною однією або декількома прийнятними групами.

«Арил» стосується необов'язково заміщеної моноциклічної, біциклічної або поліциклічної ароматичної карбоциклічної кільцевої системи з приблизно 6-14 атомами вуглецю. Приклади C_6-C_{14} арильної групи включають, але не обмежуються ними, феніл, нафтил, біфеніл, антрил, тетрагідронафтил, флуореніл, інданіл, біфеніленіл і аценафтил. Арильна група може бути незаміщеною або заміщеною однією або декількома прийнятними групами.

«Арилен» означає двовалентне моноциклічне або біциклічне, насичене, ненасичене або ароматичне карбоциклічне кільце, що має 6-14 атомів вуглецю, яке може бути незаміщеним або заміщеним однією або декількома прийнятними групами.

«Галоген» або «гало» включає фтор, хлор, бром або йод.

«Гідрокси» стосується -OH групи.

Термін «гетероцикліл» включає в себе визначення «гетероциклоалкіл» і «гетероарил». Термін «гетероциклоалкіл» стосується неароматичної, насиченої або частково насиченої, моноциклічної або поліциклічної кільцевої системи з 3-10 членів, що має щонайменше один

гетероатом або гетерогрупу, вибрану з O, N, S, S(O), $S(O)_2$, NH і C(O). Типові гетероциклоалкільні групи включають піпердиніл, піперазиніл, морфолініл, тіоморфолініл, 1,3-діоксоланіл, 1,4-діоксаніл і подібні. Гетероциклоалкільна група може бути незаміщеною або заміщеною однією або декількома прийнятними групами.

"Гетероарил" стосується ненасиченої, моноциклічної, біциклічної або поліциклічної ароматичної кільцевої системи, що містить щонайменше один гетероатом, вибраний з кисню, сірки і азоту. Приклади C_5-C_{10} гетероарильних груп включають фуран, тіофен, індол, азаіндол, оксазол, тіазол, тіадіазол, ізоксазол, ізотіазол, імидазол, N-метилімідазол, піридин, піримідин, піразин, пірол, N-метилпірол, піразол, N-метилпіразол, 1,3,4-оксадіазол, 1,2,4-триазол, 1-метил-1,2,4-триазол, 1H-тетразол, 1-метилтетразол, бензоксазол, бензотіазол, бензофуран, бензизоксазол, бензимідазол, N-метилбензимідазол, азабензимідазол, індазол, хіназолін, хінолін і ізохінолін. Біциклічні геероарильні групи включають групи, в яких фенільне, піридинове, піримідинове або піридазинове кільце конденсоване з 5- або 6-членним моноциклічним гетероциклічним кільцем, що має один або два атоми азоту в кільці, один атом азоту разом з або одним атомом кисню або одним атомом сірки в кільці, або один атом O або S в кільці. Гетероарильна група може бути незаміщеною або заміщеною однією або декількома прийнятними групами.

«Гетероатом» стосується атому сірки, азоту або кисню.

«Необов'язково заміщений або заміщений» в даному документі означає, що щонайменше один атом водню необов'язково заміщеної групи був заміщений прийнятними замісниками, представленими, але не обмеженими ними галоген, нітро, ціано, гідрокси, оксо (=O), тіо (=S), -N(C_1-C_3алкіл)C(O)(C_1-C_6алкіл), -NHC(O)(C_1-C_6алкіл), -NHC(O)(циклоалкіл), -NHC(O)(арил), -NHC(O)(гетероцикліл), -NHC(O)(гетероарил), -NHC(O)H, -C(O)NH_2, -C(O)NH(C_1-C_6алкіл), -C(O)NH(циклоалкіл), -C(O)NH(гетероцикліл), -C(O)NH(гетероарил), -C(O)N(C_1-C_6алкіл)(C_1-C_6алкіл), -S(O)NH(C_1-C_6алкіл), -$S(O)_2$NH(C_1-C_6алкіл), -S(O)NH(циклоалкіл), -$S(O)_2$NH(циклоалкіл), карбокси, -C(O)O(C_1-C_6алкіл), -C(O)(C_1-C_6алкіл), =N-OH, заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений галоалкіл, заміщений або незаміщений алкокси, заміщений або незаміщений галоалкокси, заміщений або незаміщений алкеніл, заміщений або незаміщений алкініл, заміщений або незаміщений арил, заміщений або незаміщений арилалкіл, заміщений або незаміщений циклоалкіл, заміщений або незаміщений циклоалкенілалкіл, заміщений або незаміщений циклоалкеніл, заміщений або незаміщений аміно, заміщений або незаміщений гетероарил, заміщений або незаміщений гетероцикліл, заміщений або незаміщений гетероарилалкіл, заміщене або незаміщене гетероциклічне кільце.

Конкретні сполуки відповідно до даного винаходу, не виходячи за об'єм визначень, даних для сполук формули (I), і конкретні сполуки, отримані з формули (I), підсумовані в таблиці нижче, охоплюючи всю сукупність сполук в сполуках формули (I).

Спол.№	Найменування IUPAC
1.	1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
2.	1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксамід;
3.	5-([1,1'-біфеніл]-4-іл)-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
4.	6-([1,1'-біфеніл]-4-іл)-2-метил-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
5.	6-([1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
6.	6-([1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксамід;
7.	6-([1,1'-біфеніл]-4-іл)-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
8.	2-метил-6-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
9.	1-метил-6-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
10.	1-метил-6-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксамід;
11.	2-метил-6-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксамід;
12.	5-(4-(2,5-диметил-1H-піррол-1-іл)феніл)-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
13.	6-(4-(2,5-диметил-1H-піррол-1-іл)феніл)-2-метил-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
14.	6-(4-(2,5-диметил-1H-піррол-1-іл)феніл)-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
15.	1-метил-5-(3'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;

16.	2-метил-6-(3'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
17.	1-метил-5-(3'-(піролідин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
18.	1-метил-6-(3'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
19.	1-метил-5-(2,3,5,6-тетрафтор-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
20.	1-метил-6-(3'-(піперидин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
21.	1-метил-6-(3'-(піролідин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
22.	1-метил-5-(3'-((4-метилпіперазин-1-іл)метил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
23.	2-метил-6-(3'-(піперидин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
24.	2-метил-6-(2,3,5,6-тетрафтор-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
25.	1-метил-5-(2'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
26.	2-метил-6-(2'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
27.	1-метил-5-(2'-(піролідин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
28.	2-метил-6-(2'-(піролідин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
29.	1-метил-5-(2'-((4-метилпіперазин-1-іл)метил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-3a, 7a-дигідро-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
30.	2-метил-6-(2'-((4-метилпіперазин-1-іл)метил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
31.	1-метил-5-(4'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
32.	5-(3'-ацетамідо-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
33.	1-метил-5-(2,3,5,6-тетрафтор-3'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
34.	1-метил-5-(2,3,5,6-тетрафтор-3'-(піперидин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-ил)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота, 2,2,2-трифтороцова кислота;
35.	1-метил-5-(2,3,5,6-тетрафтор-3'-((4-метилпіперазин-1-іл)метил)-[1,1'-біфеніл]-4-ил)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
36.	1-метил-5-(2,3,5,6-тетрафтор-3'-((ізопропіламіно)метил)-[1,1'-біфеніл]-4-ил)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
37.	1-метил-5-(2,3,5,6-тетрафтор-3'-((метиламіно)метил)-[1,1'-біфеніл]-4-ил)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота;
38.	2-метил-6-(2,3,5,6-тетрафтор-3'-(піперидин-1-ілметил)-[1,1'-біфеніл]-4-ил)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота;
39.	2-метил-6-(2,3,5,6-тетрафтор-3'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбонова кислота; і
40.	5-(3'-((диметиламіно)метил)-2,3,5,6-тетрафтор-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонова кислота,

або її фармацевтично прийнятна сіль або її фармацевтично прийнятний регіоізомер.

У ще одному варіанті, даний винахід стосується сполук формули (I) для застосування в лікуванні запальних захворювань або гіперактивної імунної реакції. Більш переважно, даний винахід стосується застосування сполук формули (I) для лікування розсіяного склерозу, ревматоїдного артриту і відторгнення трансплантату.

Інші варіанти винаходу включають застосування сполук формули (I) або їх фармацевтично прийнятних похідних, солей і регіоізомерів, включаючи їх суміші у всіх співвідношеннях, як лікарського засобу.

Застосування сполук, як описано вище, і їх фармацевтично прийнятних похідних, солей і регіоізомерів, включаючи їх суміші у всіх співвідношеннях, для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики розладу, пов'язаного з дигідрооротатдегідрогеназою.

Застосування сполук, описаних вище, де розладом, пов'язаним з дигідрооротатдегідрогеназою, є аутоімунний розлад або стан, пов'язаний з гіперактивною імунною реакцією.

Застосування сполук, як описано вище, і їх фармацевтично прийнятних похідних, солей і регіоізомерів, включаючи їх суміші у всіх співвідношеннях, для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики аномалії імунорегуляції.

Застосування сполук, як описано вище, де аномалією імунорегуляції є розсіяний склероз або ревматоїдний артрит.

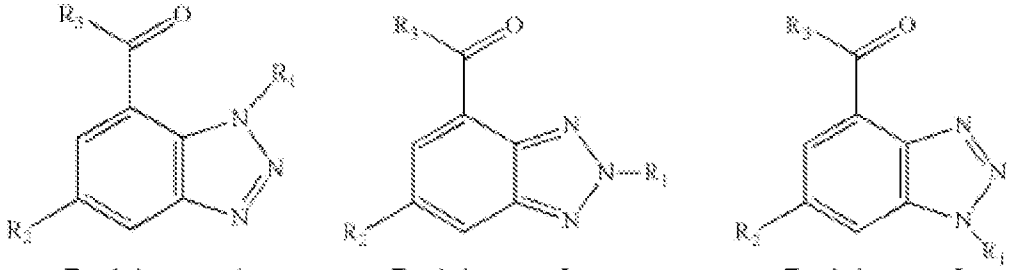
Застосування сполук, як описано вище, для приготування лікарського засобу для лікування і профілактики ракових захворювань, запальної хвороби кишечнику або ревматоїдного артриту.

У іншому варіанті, даний винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить щонайменше одну сполуку формули (I) і/або їх фармацевтично прийнятних похідних, солей і регіоізомерів, включаючи їх суміші у всіх співвідношеннях, і щонайменше один додатковий активний інгредієнт.

У даному винаході також представлена фармацевтична композиція, що містить щонайменше одну сполуку формули (I) і/або її фармацевтично прийнятні похідні, солі і регіоізомери, включаючи їх суміші у всіх співвідношеннях, в ряді випадків, один додатковий активний інгредієнт, і ексципієнти.

Термін «фармацевтично прийнятна сіль» або «фармацевтично прийнятні похідні» означає активний інгредієнт, який включає сполуку формули (I) в формі однієї з її солей, зокрема, якщо ця форма солі надає покращені фармакокінетичні властивості активному інгредієнту в порівнянні з вільною формою активного інгредієнта або будь-якою іншою сольовою формою активного інгредієнта, використаною раніше. Фармацевтично прийнятна сіль активного інгредієнта також може уперше надавати цьому активному інгредієнту бажану фармакокінетичну властивість, якої у нього не було раніше, і може навіть вплинути позитивним чином на фармакодинаміку цього активного інгредієнта відносно його терапевтичної ефективності в тілі.

Термін «регіоізомер» або «регіоізомери» стосується позиційних ізомерів, які являють собою категорію структурних ізомерів, де положення або замісник змінюють положення на початковій структурі. Тут термін «регіоізомер», не виходячи за межі об'єму сполуки формули (I), по суті, включає в себе всі регіоізомери або у вигляді чистого регіоізомеру, або у вигляді суміші двох або більш їх регіоізомерів. Оскільки фармацевтична активність регіоізомерів сполук відповідно до даного винаходу може відрізнятися, може бути бажано використати регіоізомери. У цих випадках регіоізомери можуть бути розділені на будь-якій з можливих стадій або як проміжний продукт, або як кінцевий продукт за допомогою способу, добре відомого фахівцеві в даній галузі або навіть такого, що використовується в синтезі. Регіоізомери сполук формули (I) стосуються наступних структур



Регіоізомер-1 , Регіоізомер-2 і Регіоізомер-3

Фармацевтичні склади можуть бути адаптовані для введення будь-яким бажаним прийнятним способом, наприклад, пероральним (включаючи букальний або сублінгвальний), ректальним, назальним, місцевим (включаючи букальний, сублінгвальний або трансдермальний), вагінальним або парентеральним (включаючи підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний або внутріньошкірний) способи. Такі склади можуть бути отримані з використанням всіх способів, відомих в галузі фармацевтики, наприклад, шляхом поєднання активного інгредієнта з ексципієнтом(ами) або ад'ювантом(ами).

Фармацевтичні склади, адаптовані для перорального введення, можна вводити у вигляді

окремих одиниць, таких як, наприклад, капсули або таблетки; порошки або гранули; розчини або суспензії у водних або не водних рідинах; їстівні піни або пінні продукти харчування; або рідкі емульсії масло-у-воді або рідкі емульсії вода-у-маслі.

Наприклад, у разі перорального введення у вигляді таблетки або капсули компонент активного інгредієнта може бути поєднаний з пероральним, нетоксичним і фармацевтично прийнятним інертним ексципієнтом, таким як, наприклад, етанол, гліцерин, вода і тому подібне. Порошки отримують шляхом подрібнення сполуки до відповідного дрібного розміру і змішування її з фармацевтичним ексципієнтом, подрібненим аналогічним чином, таким як, наприклад, харчовий вуглевод, такий як, наприклад, крохмаль або маніт. Ароматизатор, консервант, диспергатор і барвник також можуть бути присутніми.

Капсули отримують шляхом приготування порошкової суміші, як описано вище, і заповнення нею формованих желатинових оболонок. Гліданти і мастильні речовини, такі як, наприклад, високодисперсна кремнієва кислота, тальк, стеарат магнію, стеарат кальцію або поліетиленгліколь в твердій формі, можуть бути додані до порошкової суміші перед операцією наповнення. Розпушувач або солюбілізатор, такий як, наприклад, агар-агар, карбонат кальцію або карбонат натрію, також можуть бути додані для покращення доступності лікарського засобу після прийому капсули.

Крім того, якщо бажано або необхідно, відповідні зв'язуючі, мастильні агенти і розпушувачі, а також барвники також можуть бути включені в суміш. Відповідні зв’язувальні агенти включають крохмаль, желатин, натуральний цукор, такий як, наприклад, глюкоза або бета-лактоза, підсолоджувачі, вироблені з кукурудзи, натуральний і синтетичний каучук, такий як, наприклад, аравійська камедь, трагакант або альгінат натрію, карбоксиметилцелюлозу, поліетиленгліколь, віск і подібні. Мастильні агенти, що використовуються в цих дозованих формах, включають олеат натрію, стеарат натрію, стеарат магнію, бензоат натрію, ацетат натрію, хлорид натрію і подібні. Розпушувачі включають, без обмежень, крохмаль, метилцелюлозу, агар, бентоніт, ксантанову камедь і подібні. Таблетки утворюють, наприклад, приготуванням порошкової суміші, гранулюванням або сухим пресуванням суміші, додаванням змащуючої речовини і розпушувача і пресуванням всієї суміші з отриманням таблеток. Порошкову суміш готують шляхом змішування сполуки, подрібненої відповідним чином, з розріджувачем або основою, як описано вище, і, необов'язково, зі зв’язувальним агентом, таким як, наприклад, карбоксиметилцелюлоза, альгінат, желатин або полівінілпіролідон, уповільнювачем розчинення, таким як, наприклад, парафін, прискорювачем абсорбції, таким як, наприклад, четвертинна сіль, і/або абсорбентом, таким як, наприклад, бентоніт, каолін або дикальційфосфат. Порошкова суміш може бути гранульована змочуванням її зв’язувальним агентом, таким як, наприклад, сироп, крохмальна паста, акадійська суміш розчинів камедей або розчини целюлози або полімерних матеріалів, і продавлюванням її через сито. Як альтернатива грануляції, порошкова суміш може бути пропущена через таблетувальну машину, з отриманням шматків неоднорідної форми, які розбиваються з утворенням гранул. Гранули можуть бути змазані додаванням стеаринової кислоти, стеарату, тальку або мінеральної олії, щоб запобігти прилипанню до форм для лиття таблеток. Потім змазану суміш пресують з отриманням таблеток. Активні інгредієнти також можуть бути об'єднані з вільно текучим інертним ексципієнтом і потім спресовані безпосередньо з отриманням таблеток без проведення стадій гранулювання або сухого пресування. Може бути присутнім прозорий або непрозорий захисний шар, що складається з герметизуючого шару шелаку, шару цукру або полімерного матеріалу і глянсового шару воску. Барвники можуть бути додані до цих покриттів для того, щоб можна було розрізнювати різні дозовані одиниці.

Пероральні рідини, такі як, наприклад, розчин, сиропи і еліксири, можуть бути приготовані у формі дозованих одиниць так, щоб дана кількість включала заздалегідь певну кількість сполук. Сиропи можуть бути приготовані шляхом розчинення сполук у водному розчині з прийнятним ароматом, а еліксири готуються з використанням нетоксичного спиртового носія. Суспензії можуть бути виготовлені диспергуванням сполук в нетоксичному носії. Також можуть бути додані солюбілізатори і емульгатори, такі як, наприклад, етоксиловані ізостеарилові спирти і простий ефір поліоксіетиленсорбітолу, консерванти, смакові добавки, такі як, наприклад, олія перцевої м'яти або натуральні підсолоджувачі або сахарин, або інші штучні підсолоджувачі і подібні.

Склади дозованих одиниць для перорального введення, при бажанні, можуть бути упаковані в мікрокапсули. Склад також може бути приготований таким чином, щоб вивільнення було збільшене або уповільнене, наприклад, шляхом нанесення покриття або вбудовування матеріалу у вигляді частинок в полімери, віск і подібні.

Нові тризаміщені похідні бензотриазолу формули (I) і їх фармацевтично прийнятні солі і

фізіологічно функціональні похідні, а також інші активні інгредієнти також можуть вводитися у формі ліпосомних систем доставки, таких як, наприклад, малі одношарові везикули, великі одношарові везикули і багатошарові везикули. Ліпосоми можуть бути утворені з прийнятних жирів або фосфоліпідів або обох, таких як, наприклад, холестерин, стеариламін або фосфатидилхоліни або подібні.

Фармацевтичні склади, адаптовані для трансдермального введення, можуть вводитися у вигляді незалежних пластирів для розширеного, тісного контакту з епідермісом реципієнта. Таким чином, наприклад, активний інгредієнт може бути доставлений з пластиру за допомогою іонтофорезу, як описано в загальних рисах в Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986).

Фармацевтичні сполуки, адаптовані для місцевого введення, можуть бути виготовлені у вигляді мазей, кремів, суспензій, лосьйонів, порошків, розчинів, паст, гелів, спреїв, аерозолів або олій.

Для лікування очей або інших зовнішніх тканин, наприклад, рота і шкіри, склади переважно наносять у вигляді мазі або крему для місцевого застосування. У випадку, коли треба приготувати мазь, активний інгредієнт може застосовуватися або з парафіновою основою, або з основою, що змішується з водою, для крему. Альтернативно, активний інгредієнт може бути виготовлений з отриманням крему з основи для крему масло-у-воді або основою вода-у-маслі.

Фармацевтичні препарати, адаптовані для місцевого нанесення на очі, включають очні краплі, в яких активний інгредієнт розчинений або суспендований у прийнятному носії, зокрема, у водному розчиннику.

Фармацевтичні склади, адаптовані для місцевого застосування у роті, включають таблетки для розсмоктування, пастилки і рідини для полоскання рота.

Фармацевтичні склади, адаптовані для ректального введення, можуть вводитися в формі супозиторіїв або клізм.

Фармацевтичні склади, адаптовані для назального введення, в яких речовина-носій являє собою тверду речовину, містять грубий порошок з розміром частинок, наприклад, в діапазоні 20-500 мікрон, який вводять способом, яким приймається нюхальний порошок, тобто шляхом швидкого вдихання через носові проходи з контейнера, що містить порошок, який тримають близько до носа. Прийнятні склади для введення у вигляді назального спрею або крапель в ніс з рідиною як речовина-носій включають розчини активного інгредієнта у воді або олії.

Фармацевтичні склади, адаптовані для введення шляхом інгаляції, охоплюють дрібнодисперсний пил або туман, які можуть бути отримані різними типами розпилювачів під тиском з аерозолями, розпилювачами або інсуфляторами.

Фармацевтичні склади, адаптовані для вагінального введення, можуть бути введені у вигляді песаріїв, тампонів, кремів, гелів, паст, пін або спреїв. Фармацевтичні склади, адаптовані для парентерального введення, включають водні і неводні стерильні ін'єкційні розчини, що містять антиоксиданти, буфери, бактеріостатики і розчинені речовини, за допомогою яких склад стає ізотонічним до крові реципієнта, що лікується; і водні і неводні стерильні суспензії, які можуть містити суспендовані середовища і загущувачі. Склади можуть бути введені в контейнерах з однократною дозою або декількома дозами, наприклад, в запаяних ампулах і флаконах, і зберігатися у висушеному виморожуванням (ліофілізованому) стані, так що потрібне тільки додавання стерильної рідини-носія, наприклад, води для ін'єкцій, безпосередньо перед застосуванням.

Ін'єкційні розчини і суспензії, приготовані відповідно до рецептури, можуть бути приготовані з стерильних порошків, гранул і таблеток.

Само собою зрозуміло що, на доповнення до окремо згаданих вище складових, склади можуть також включати інші агенти, що прийнятні в даній галузі техніки, з урахуванням конкретного типу складу; таким чином, наприклад, склади, які підходять для перорального введення, можуть містити ароматизатори.

Терапевтично ефективна кількість сполуки формули (I) і іншого активного інгредієнта залежить від ряду факторів, включаючи, наприклад, вік і вагу тварини, точне захворювання, яке вимагає лікування, і його тяжкість, природу складу і спосіб введення, і, в кінцевому результаті, визначається лікуючим лікарем або ветеринаром. Однак ефективна кількість сполуки зазвичай складає від 0,1 до 100 мг/кг маси тіла реципієнта (ссавця) на добу, і зазвичай, в інтервалі від 1 до 10 мг/кг маси тіла на добу. Таким чином, фактична кількість на добу для дорослого ссавця, що важить 70 кг, зазвичай складає від 70 до 700 мг, де цю кількість можна вводити у вигляді окремої дози на добу або зазвичай у вигляді серії часткових доз (таких як, наприклад, дві, три, чотири, п'ять або шість) на добу, так що загальна добова доза залишається однаковою. Ефективна кількість солі або сольвату або їх фізіологічно функціонального похідного може бути визначено як частка ефективної кількості сполуки як такої.

У ще одному варіанті, даний винахід стосується способу лікування раку у суб'єкта, що потребує такого лікування, що включає стадію введення суб'єкту одного або декількох разів терапевтично ефективної кількості щонайменше однієї сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, описаної тут.

У ще одному варіанті, даний винахід стосується способу інгібування росту і/або метастазів пухлинних клітин у суб'єкта, що включає стадію введення суб'єкту одного або декількох разів терапевтично ефективної кількості щонайменше однієї сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, описаної тут.

У ще одному варіанті, даний винахід стосується способу інгібування активності ферменту дигідрооротатоксигенази в пухлинній клітині, що включає стадію контакту пухлинної клітини один або декілька разів з терапевтично ефективною кількістю щонайменше однієї сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, описаної тут. У цьому варіанті пухлинні клітини контактують in vivo, ex vivo або in vitro.

Сполуки, їх фармацевтично прийнятні солі і фармацевтичні склади і композиції, описані в даному описі, є корисними для лікування раку у суб'єкта, що потребує такого лікування. Одночасно можуть бути інгібовані ріст пухлинних клітин і/або метастази або активність ферменту дигідрооротатоксигенази. Сполуки і фармацевтична композиція можуть вводитися один або декілька разів для досягнення терапевтичного ефекту. Як відомо в даній галузі, фахівець в даній галузі техніки здатний визначити дозу, режими дозування і шляхи введення залежно від стану, що підлягає лікуванню, і суб'єкта, що потребує лікування. Типові приклади раку включають гематологічні злоякісні утворення, такі як, але не обмежені ними, гострий мієлоїдний лейкоз, множинну мієлому, В-пролімфоцитарний лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз і хронічний лімфолейкоз. Типові приклади раку включають лімфоми, такі як, але не обмежені ними, хворобу Ходжкіна, неходжкінську лімфому, фолікулярну лімфому, дифузну В-великоклітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому і мантійно-клітинну лімфому. Типові приклади раку включають солідний рак, такий як, але не обмежений ними, рак легень, рак молочної залози, тричі негативний рак молочної залози, меланому, гліобластому, рак простати, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак кістки, рак голови або шиї, рак шкіри, шкірний або внутріньоочний злоякісний ендометрій, карциному шийки матки, карциному піхви, карциному вульви, рак стравоходу, рак тонкої кишки, рак ендокринної системи, рак щитовидної залози, рак паращитовидної залози, рак надниркової залози, саркому м'яких тканин, рак сечовивідного каналу, рак статевого члена, солідні пухлини дитячого віку, лімфоцитарну лімфому сечового міхура, рак нирки або сечоводу, карциному ниркової миски, новоутворення центральної нервової системи (ЦНС), первинну лімфому ЦНС, ангіогенез пухлини, пухлину хребта, гліому стовбура мозку, аденому гіпофізу, саркому Капоші, епідермоїдний рак, рак пласких клітин, Т-клітинну лімфому, рак, викликаний навколишнім середовищем і рак мутанту PTEN.

У іншому аспекті, даний винахід стосується способу отримання тризаміщених похідних бензотриазолу формули (I).

Інгібітори дигідрооротатдегідрогенази формули (I) можуть бути отримані з легкодоступних матеріалів із застосуванням наступних загальних способів і методик. Має бути зрозуміло, що якщо надані типові або переважні експериментальні умови (тобто, температури реакції, часу, моля реагентів, розчинники і т.д.), інші експериментальні умови також можуть застосовуватися, якщо не вказане інше. Оптимальні умови реакції можуть варіюватися залежно від конкретних використовуваних реагентів або розчинників, але такі умови можуть бути визначені фахівцем в даній галузі з використанням рутинних процедур оптимізації. Крім того, використовуючи детально описані процедури, фахівець в даній галузі може отримати додаткові сполуки відповідно до даного винаходу, заявлені тут. Всі температури наведені в градусах Цельсію (°C), якщо не зазначено інше.

У додатковому аспекті, сполуки відповідно до даного винаходу можуть також містити ненатуральні частинки атомних ізотопів на одному або більше атомах, які складають такі сполуки. Наприклад, даний винахід також охоплює ізотопно-мічені варіанти даного винаходу, які ідентичні тим, що перераховані тут, але фактично, один або декілька атомів сполуки замінені атомом, що має атомну масу або масове число, що відмінні від переважаючої атомної маси або масового числа, що звичайно зустрічається в природі для атома. Всі ізотопи будь-якого конкретного атома або елемента, як зазначено, включені в об'єм сполук відповідно до даного винаходу і їх застосування. Типові ізотопи, які можуть бути включені в сполуку відповідно до даного винаходу, включають ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню, фосфору, сірки, фтору, хлору і йоду, такі як ^{2}H (“D”), ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{13}N, ^{15}N, ^{15}O, ^{17}O, ^{18}O, ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S, ^{18}F, ^{36}Cl, ^{123}I і ^{125}I. Ізотопно-мічені сполуки відповідно до даного винаходу зазвичай можуть бути

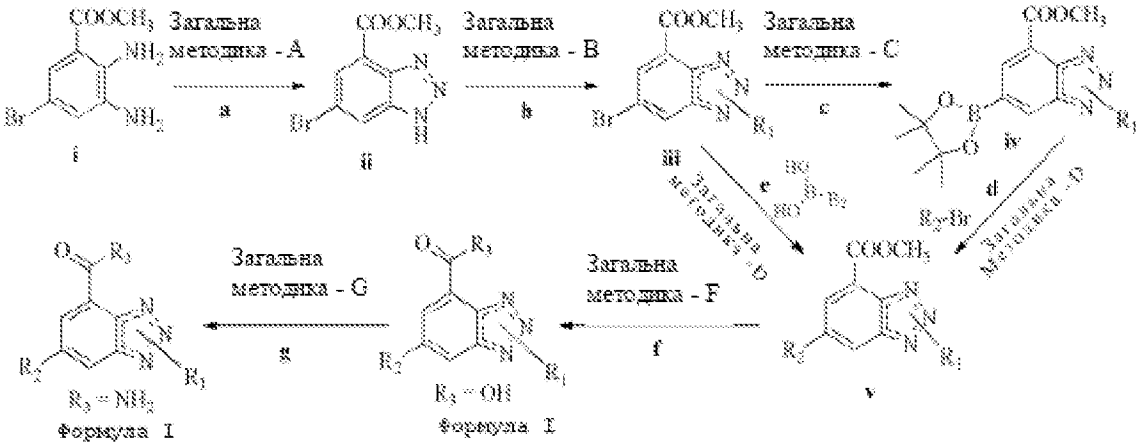
отримані за допомогою наступних процедур, що аналогічні до тих, які описані на схемах і/або в наведених нижче прикладах, шляхом заміни ізотопно-міченим реагентом не ізотопно-міченого реагенту.

Наступні абревіатури відносяться відповідно до визначень нижче:

AcOH (оцтова кислота), АЦН (ацетонітрил), АТФ (аденозин трифосфат), АБС (альбумін бичачої сироватки), $CHCl_3$ (хлороформ), Cs_2CO_3 (карбонат цезію), ДХМ (дихлорметан), ДІПЕА (діізопропілетиламін), ДМСО (диметилсульфоксид), ДМФ (N, N-диметилформамід), EDCI.HCl (гідрохлорид 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіміду), Et_3N (триетиламін), EtOAc (етилацетат), EtOH (етанол), ГОБТ (гідроксибензотриазол), HCl (гідрохлорид), K_2CO_3 (карбонат калію), KOAc (ацетат калію), хв. (хвилина), MeOH (метанол), MeI (метилйодид), $MgSO_4$ (сульфат магнію), NH_4Cl (хлорид амоній), $NH_4(CO_3)_2$ (карбонат амонію), $Pd(dppf)_2Cl_2$ [1,1-біс(дифенілфосфіно)фероцен](дихлорпаладій (II)), NaH (гідрид натрію), $NaNO_2$ (нітрит натрію), $NaHCO_3$ (бікарбонат натрію), ПетЕфір (петролейний ефір), ФРФБ (фізіологічний розчин з фосфатним буфером), КТ-кімнатна температура (25°C-35°C), ТЕА (триетиламін), ТФК (трифтороцтова кислота), ТГФ (тетрагідрофуран), t-BuOK (трет-бутоксид калію), ТМСЙ (триметилсилілйодид), ТШХ (тонкошарова хроматографія), H_2O - вода; мл - мілілітр; год./год. - година; N - нормальність; М - молярність; с - синглет; д - дублет; т - триплет; м - мультиплет; ^1H ЯМР - протонний ядерний магнітний резонанс; МС – мас-спектроскопія; РХ – рідинна хроматографія; ВЕРХ - високоефективна рідинна хроматографія, J - константа поєднання; ^1H - протон; МГц - мега Герц (частота); Гц - Герц; шс - широкий синглет; ЕР - електророзпилення; конц. - концентрований; г - грам; ммоль або мМ - мілімолярний; мкМ - мікромолярний; нМ - наномолярний; УФ - ультрафіолет; °C - градуси Цельсія, M^+ - молекулярний іон, % - відсоток; мк - мікрон; і δ - дельта; безв. - безводний; pH - водневий іон;

У іншому варіанті даного винаходу представлені способи, що застосовуються для отримання сполук формули (I), наведених в прикладах нижче і загалом описаних на схемі I. Спеціаліст в даній галузі техніки зрозуміє, що Схема I може бути адаптована для отримання сполук формули (I) і фармацевтично прийнятних солей сполук формули (I) відповідно до даного винаходу. Де всі символи/змінні такі, як описані вище, якщо не зазначено інше.

Спосіб представлений Схемою I:



Сполуки відповідно до даного винаходу можуть бути отримані із застосуванням синтетичних перетворень, ілюстрованих на Схемі I. Початкові матеріали є комерційно доступними, можуть бути отримані за допомогою методик, описаних тут, за допомогою літературних методик або за допомогою методик, які можуть бути добре відомі фахівцеві в галузі органічної хімії. Вихідна речовина 5-заміщений метил 2,3-диамінобензоат отримують за методиками, що описані в WO 2010115736A2.

Стадія-a: Сполуку-i піддають взаємодії з нітритом натрію в кислому середовищі із застосуванням загальної методики-A з отриманням сполуки-ii.

Стадія-b: Сполуку-ii далі піддають N-алкілуванню із застосуванням метилйодиду в основних умовах, таких, як описані в загальній методиці-B з отриманням сполуки формули-iii.

Стадія-c: Сполуку формули-iii піддають взаємодії з дибораном біспінаколату в основному середовищі в присутності прийнятного паладієвого каталізатора із застосуванням загальної методики-C з отриманням сполук формули-iv.

Стадія-d: Сполуку формули-iv обробляють заміщеним арилгалогенідом в присутності

прийнятного паладієвого каталізатора із застосуванням умов, такі як описані в загальної методиці-D з отриманням сполуки формули-v.

Стадія-e: Альтернативно сполуки формули-v можуть бути отримані із сполук формули-iii із застосуванням відповідних боронових кислот, у прийнятних умовах, таких, як описані в загальній методиці-D.

Стадія-f: Отримані сполуки формули-v піддають гідролізу зі складним ефіром в основних умовах, таких як описані в загальній методиці-F з отриманням сполук формули (I) (де R_3=OH).

Стадія-g: Карбонові кислоти формули (I) обробляють хлоридом амонію із застосуванням умов, які описані в загальній методиці-G з отриманням відповідних сполук формули (I) (де R_3=NH_2).

Якщо вищезгаданий набір загальних способів синтезу не може бути застосований для отримання сполук формули (I) і/або необхідних проміжних сполук для синтезу сполук формули (I), потрібно використати відповідні способи отримання, що відомі фахівцеві в даній галузі. Як правило, шляхи синтезу для будь-якої окремої сполуки формули (I) будуть залежати від конкретних замісників кожної молекули і від доступності необхідних проміжних сполук; знову ж, такі фактори відомі фахівцям в даній галузі.

Сполуки відповідно до даного винаходу можуть бути виділені в поєднанні з молекулами розчинника шляхом кристалізації при випаровуванні прийнятного розчинника. Фармацевтично прийнятні кислотно-адитивні солі сполук формули (I), які містять основний центр, можуть бути отримані загальноприйнятим способом. Наприклад, розчин вільної основи може бути оброблений прийнятною кислотою або в чистому вигляді, або у відповідному розчині, і отримана сіль виділена або фільтрацією, або випаровуванням у вакуумі реакційного розчинника. Фармацевтично прийнятні основно-адитивні солі можуть бути отримані аналогічним чином шляхом обробки розчину сполуки формули (I) прийнятною основою. Обидва типи солей можуть бути сформовані або взаємоперетворені з використанням методик із застосуванням іонообмінної смоли.

Хоча винахід ілюструється деякими з наступних прикладів, його не потрібно тлумачити як обмежений ними; швидше, винахід охоплює загальну область, як описано вище. Різні модифікації і варіанти втілення можуть бути зроблені без відхилення від суті і об'єму.

ПРИКЛАДИ

Загальні моменти:

Дані МС, представлені в прикладах, описаних нижче, отримують наступним чином: мас спектр: LC/MS Waters ZMD (ESI) або Waters Acquity SOPC (ESI).

Дані ЯМР, представлені в прикладах, описаних нижче, отримують наступним чином: ^{1}H-ЯМР: Bruker DPX-300 MHz або Bruker DPX 400 MHz.

Дані ВЕРХ, представлені в прикладах, описаних нижче, отримують наступним чином.

Умови A: колонка Waters Xbridge™ C_8 50 мм × 4,6 мм з потоком 2 мл/хвилина; 8 градієнт від 0,1% ТФК в H_2O до 0,07% ТФК в CH_3CN.

Умови B: C18 BDS (4,6×250) мм, SC\244 з потоком 0,7 мл/хвилина; 10 хвилин градієнт від 0,1% ТФК в H_2O до CH_3CN.

Умови препаративної ВЕРХ: колонка Zorbax Eclipse XDB C18 PrepHT (150 × 21,2 мм, 5 мкм); рухома фаза: (A) 0,01% ТФК або 0,1% ТФК; (B) АЦН або АЦН:MeOH (1:1);

Потік: 20 мл/хвилина.

Очищення препаративної ВЕРХ проводять з апаратом мас-направленого самоочищення Fractionlynx від Waters, обладнаним колонкою Sunfire Prep C18 OBD 19×100 мм 5 мкм, якщо не зазначено інакше. Всі очищення ВЕРХ проводять з градієнтом АЦН/H_2O або АЦН/H_2O/HCOOH (0,1%).

Сполуки відповідно до даного винаходу названі по стандартах, що застосовуються в програмі ACD/Name Batch від “Advanced Chemistry Development Inc., ACD/Labs (7,00 Release)". Версія продукту: 7,10 створена: 15 вересня 2003.

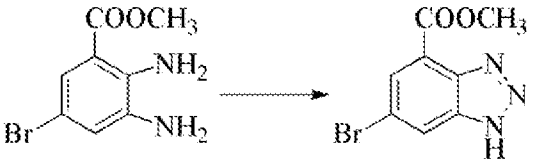
Методика для сполук формули (I) детально описана нижче в загальних методиках, включаючи загальний синтез різних проміжних сполук, що беруть участь в процесі отримання сполук відповідно до даного винаходу.

Загальна методика-A: отримання заміщених [1,2,3]бензотриазолів

У колбу, що містить 6-заміщений або заміщений складний діаміноефір (1-3 екв.) в оцтовій кислоті перемішують протягом 10-20 хвилин, переважно, 10 хвилин, з подальшим додаванням (нітриту натрію, нітриту калію, переважно, нітриту натрію) (2,5-3,5, переважно, 2,5 екв.) у воді. Реакційну суміш перемішують протягом 1-2 год, переважно, 1 год при КТ. Відділену тверду речовину збирають фільтрацією і сушать у вакуумі з отриманням цільових продуктів.

Ілюстративний приклад загальної методики-A:

Отримання A.1: Синтез метил 6-бром-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилату:



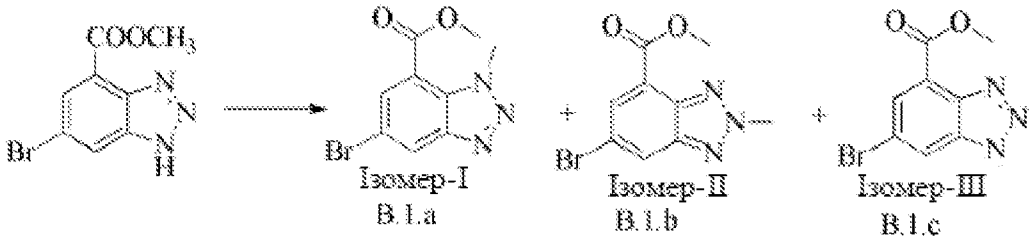
Розчин метил 2,3-диаміно-5-бромбензоату (1,0 г, 4,08 ммоль) (Посилання: WO2010/115736 A2) в оцтовій кислоті (15 мл) перемішують протягом 10 хв. при КТ. Додають нітрит натрію (0,309 г, 4,48 ммоль) у воді (2 мл), і реакційну суміш перемішують протягом близько 30 хв при КТ. Тверду речовину, що випала в осад, фільтрують, промивають водою і сушать у вакуумі з отриманням бажаного продукту (0,8 г, 77%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 16,19 (с, 1H), 8,70 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 3,99 (с, 3H) і РХ-МС m/z: 258 $(M+H)^+$.

Загальна методика-B: N-алкілування заміщених бензотриазолів

До розчину заміщених бензотриазолів-похідного карбоксилату (1 екв.) в органічному розчиннику (такому як ДМФ, ТГФ, діоксан, переважно, ДМФ), що перемішується, додають відповідну основу (таку як K_2CO_3, CS_2CO_3, NaH і т.д., переважно, K_2CO_3, 2-5 еквіваленти, переважно, 2 екв.) потім алкілгалогенід (2-5 екв., переважно, 3 екв.). Реакційну суміш перемішують при КТ протягом близько 1-10 год (переважно, 3 год). Реакційну суміш виливають в крижану воду, і тверду речовину, що відділилася, збирають фільтрацією і сушать у вакуумі. Регіоізомери розділяють хроматографією на колонці з отриманням бажаних продуктів.

Ілюстративний приклад загальної методики-B:

Отримання B.1: Синтез метил 5-бром-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилату, метил 6-бром-2-метил-2H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилату і метил 6-бром-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилату



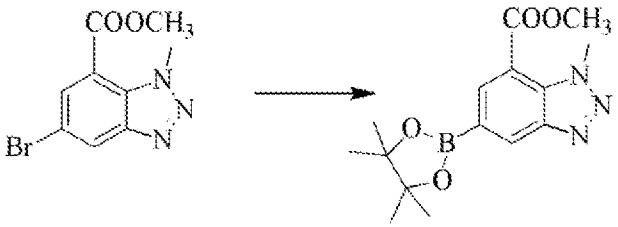
До перемішуваного розчину метил 6-бром-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилату (4,5 г, 17,5 ммоль, отримання A, 1) в ДМФ (25 мл) додають карбонат калію (4,85 г, 35,15 ммоль), потім метилйодид (7,48 г, 52,73 ммоль). Реакційну суміш перемішують при КТ протягом 1 год. Реакційну суміш гасять крижаною водою (100 мл) і тверду речовина, що відділилася, збирають фільтрацією, сушать у вакуумі. Отриману неочищену сполуку очищають хроматографією на колонці з силікагелем (100-200 меш) із застосуванням 10% етилацетату в гексані з отриманням ізомеру-I (B, 1.a) (1,9 г); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,40 (с, 1H), 8,22 (с, 1H), 4,57 (с, 3H), 4,01 (с, 3H) і РХ-МС m/z: 272 $(M+2)^+$; 15-20% етилацетату в гексані з отриманням ізомера-II (B, 1.b) (1,4 г); ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,26 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 4,58 (с, 3H), 4,04 (с, 3H) і РХ-МС m/z: 272,0 $(M+2)^+$; 20-25% етилацетату в гексані з отриманням ізомеру-III (B, 1.c) (1,0 г); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,67 (с, 1H), 8,13 (с, 1H), 4,45 (с, 3H), 3,96 (с, 3H) і РХ-МС m/z: 272,0 $(M+2)^+$.

Загальна методика-C: отримання боронового ефіру

Суміш похідного галогенарилу (1,0-3,0 екв., переважно, 1,0 екв.), прийнятної неорганічної основи (такої як KOAC або Na_2CO_3 або K_2CO_3 або Cs_2CO_3, переважно, KOAC), диборану біспінаколату (1,0-3,0 екв., переважно, 1,1 екв.) в діоксані дегазують з азотом протягом близько 10-15 хв, і додають [1,1-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію (II) (0,001-0,010 екв., переважно, 0,05 екв.). Реакційну суміш перемішують при температурі кипіння із зворотним холодильником під азотом протягом близько 3-12 год (переважно, близько 6 год). Реакційну суміш охолоджують до КТ і випаровують досуха при зниженому тиску. Залишок повторно розчиняють в EtOAc, промивають послідовно водою і сольовим розчином. Органічний розчин сушать над Na_2SO_4, фільтрують і концентрують при зниженому тиску. Продукт очищують кристалізацією або розтиранням з прийнятним розчинником або розчинниками або препаративною ВЕРХ або флеш-хроматографією.

Ілюстративний приклад загальної методики-C:

Отримання С.1: Синтез метил 1-метил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-іл)-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилату



Суміш метил 5-бром-1-метил-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилату (1,0 г, 3,7 ммоль, отримання В.1.а), ацетату калію (0,627 г, 5,92 ммоль), диборану біспінаколату (0,93 г, 3,7 ммоль) в діоксані (60 мл) дегазують азотом протягом близько 15 хв і додають [1,1-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію(II) (0,151 г, 0,018 ммоль). Реакційну суміш перемішують при температурі кипіння із зворотним холодильником протягом 6 год. під азотом. Реакційну суміш охолоджують до КТ і випарюють досуха при зниженому тиску. Отриманий залишок повторно розчиняють в EtOAc, промивають послідовно водою і сольовим розчином і концентрують. Отриману неочищену сполуку очищують хроматографією на колонці з силікагелем (60-120 меш) із застосуванням 30% етилацетату в гексані з отриманням бажаного продукту (0,9 г, 77%); ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,46 (с, 1Н), 8,31 (с, 1Н), 4,59 (с, 3Н), 3,94 (с, 3Н), 1,35 (с, 12Н) і РХ-МС m/z=318,2 $(M+H)^+$.

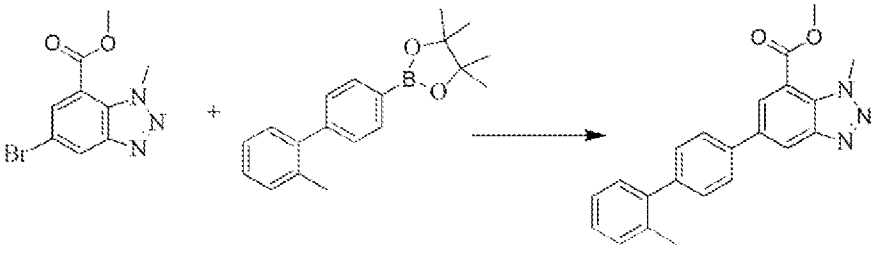
Інші сполуки, синтезовані із застосування загальної методики С, описані в таблиці С.1

Загальна методика-D: реакція Сузукі

Суміш ацетонітрилу і води (8:2) дегазують азотом протягом близько 10-15 хв, потім додають прийнятну основу (таку як Na_2CO_3 або K_2CO_3 або Cs_2CO_3, переважно, Na_2CO_3), потім похідне арилброму (1,0-3,0 екв., переважно, 1,0 екв.) і прийнятну боронову кислоту (1,0-3,0 екв., переважно, 1,5 екв.). Реакційну суміш знову дегазують протягом 15 хв і, нарешті, додають [1,1-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладій (II) (0,001-0,010 екв., переважно, 0,05 екв.). Реакційну суміш перемішують при температурі кипіння із зворотним холодильником під азотом протягом близько 3-12 год (переважно, близько 4 год). Реакційну суміш охолоджують до КТ і випарюють досуха при зниженому тиску. Отриманий залишок повторно розчиняють в EtOAc, промивають послідовно водою і сольовим розчином. Органічний розчин сушать над Na_2SO_4, фільтрують і концентрують при зниженому тиску. Продукт очищують кристалізацією або розтиранням з прийнятного розчинника або розчинників або препаративної ВЕРХ або флеш-хроматографією.

Ілюстративний приклад загальної методики-D:

Отримання D.1: Синтез метил 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилат



Суміш ацетонітрилу (80 мл) і води (15 мл) дегазують азотом протягом 10 хв. Додають карбонат натрію (2,74 г, 25,9 ммоль), потім метил 5-бром-1-метил-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилат (3,5 г, 12,9 ммоль) і 4,4,5,5-тетраметил-2-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1,3,2-діоксаборолан (3,81 г, 12,0 ммоль) (С.1.5). Реакційну суміш знову дегазують протягом 15 хв. Нарешті, додають [1,1-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладій (II) (0,526 г, 0,64 ммоль). Реакційну суміш перемішують при температурі кипіння із зворотним холодильником протягом 5 год під азотом. Реакційну суміш охолоджують до КТ і випаровують досуха при зниженому тиску. Отриманий залишок повторно розчиняють в EtOAc, промивають послідовно водою і сольовим розчином і концентрують. Отриману неочищену сполуку очищають хроматографією на колонці з силікагелем (60-120 меш) із застосуванням 30% етилацетату в гексані з отриманням бажаного продукту (3,6 г, 77%); ^{1}Н ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,52 (с, 1Н), 8,31 (с, 1Н), 7,76-7,74

(д, J=8,0 Гц, 2H), 7,48-7,46 (д, J=7,6, 2H), 7,31-7,28 (м, 4H), 4,63 (с, 3H), 4,08 (с, 3H), 2,34 (з, 3H) і РХ-МС m/z=358,2 $(M+H)^+$.

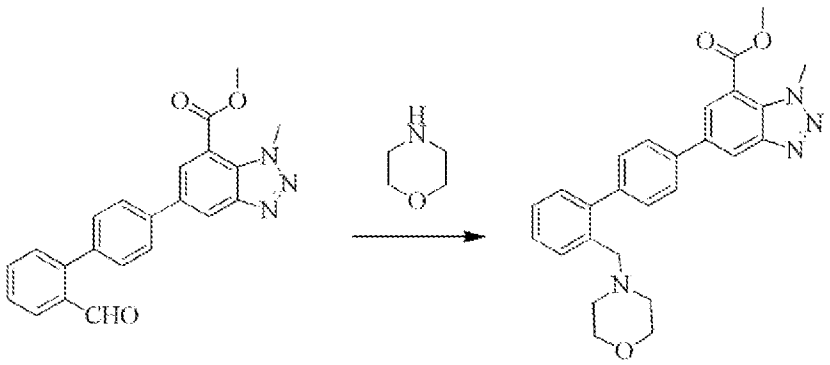
Інші сполуки, синтезовані із застосування загальної методики D, описані в таблиці D.1.

Загальна методика E: відновлювальне амінування

Суміш прийнятного альдегіду і аміну в органічному розчиннику (такому як ДХМ, ТГФ, АЦН, ДМФ, ДХЕ або діоксан) перемішують при кімнатній температурі протягом від 30 хв до 4 год. Отриману реакційну суміш охолоджують до 0°C і додають відновлювальний агент, такий як триацетоксиборгідрид натрію, невеликими порціями, потім каталітичну кількість оцтової кислоти. Отриману реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2-4 год. Розвиток реакції відстежують ТШХ, і реакційну суміш гасять водним розчином бікарбонату натрію. Потім її екстрагують етилацетатом, об'єднані органічні шари сушать над сульфатом натрію і концентрують у вакуумі з отриманням цільової сполуки. Необов'язково, цільова сполука може бути очищена кристалізацією або розтиранням з прийнятного розчинника або розчинників, або препаративної ВЕРХ або флеш-хроматографією.

Ілюстративний приклад загальної методики-E:

Отримання E.1: Синтез метил 1-метил-5-(2'-(морфолінометил)-[1,1'- біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилату



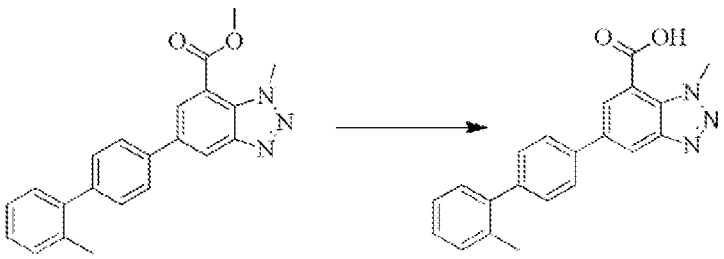
Розчин метил 5-(2'-форміл-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1-метил-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилату (0,300 г, 0,8 ммоль, D.1.8) і морфоліну (0,070 г, 0,8 ммоль) в ДХЕ (15 мл) перемішують протягом 30 хв при кімнатній температурі. Реакційну суміш охолоджують до 0°C, додають триацетоксиборгідрид натрію (0,342 г, 1,6 ммоль), потім оцтову кислоту (0,2 мл). Реакційну суміш перемішують протягом 2 год при кімнатній температурі. Реакційну суміш гасять водним розчином бікарбонату натрію (50 мл). Її екстрагують етилацетатом (3×50 мл), об'єднані органічні шари сушать над сульфатом натрію і концентрують при зниженому тиску. Отриманий неочищений продукт беруть на наступній стадії без очищення (0,200 г); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,69 (с, 1H), 8,696 (с, 1H), 8,424-8,422 (д, J=8 Гц, 2H), 7,912-7,891 (д, J=8 Гц, 2H), 7,607 (м, 1H), 7,531-7,324 (м, 3H), 4,50 (с, 3H), 4,0 (с, 3H), 3,560 (м, 4H), 3,55 (с, 2H), 3,308 (м, 4H) і РХ-МС m/z=443,3 $(M+H)^+$.

Загальна методика-F: гідроліз складним ефіром

У колбу, що містить прийнятний складний алкіловий ефір у водному органічному розчиннику (такому як ТГФ або метанол, 1,4-діоксан, переважно, 1,4-діоксан) додають 1,5 екв. водного розчину гідроксиду натрію, і реакційну суміш кип'ятять із зворотним холодильником протягом 1-8 год. (переважно, 4 год). Завершення реакції відстежують ТШХ. Надлишок розчинника видаляють у вакуумі, і розчин підкислюють 10% розчином HCl. Відділену тверду речовину збирають фільтрацією і сушать у вакуумі з отриманням цільового похідного карбонової кислоти. Необов'язково, цільова сполука може бути очищена кристалізацією, або розтиранням з прийнятного розчинника або розчинників, або препаративної ВЕРХ або флеш-хроматографією.

Ілюстративний приклад загальної методики-F:

Приклад 1: Синтез 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонової кислоти (сполука-1)



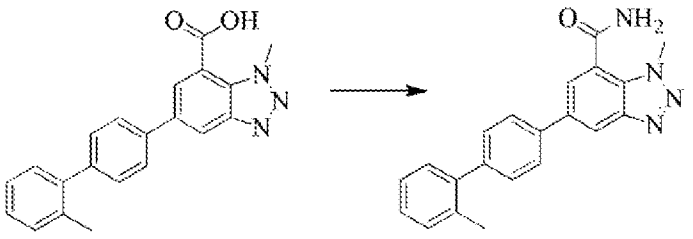
До перемішуваного розчину метил 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилату (1,2 г, 3,361 ммоль, D.1) в 1,4 діоксані (15 мл) додають водн. 2N NaOH (15 мл). Реакційну суміш кип'ятять із зворотним холодильником протягом 4 год. Після завершення реакції реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, надмірний розчинник видаляють при зниженому тиску, і розчин підкисляють 10% розчином HCl (pH~2). Відділену тверду речовину збирають фільтрацією і сушать у вакуумі з отриманням вказаної в заголовку сполуки у вигляді білуватої твердої речовини (1,1 г, 95%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,35 (шс, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 7,89-7,87 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,51-7,49 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,32-7,25 (м, 4H), 4,58 (с, 3H) 2,30 (с, 3H) і РХ-МС m/z=344,1 $(M+H)^+$.

Загальна методика-G: отримання аміду

У колбу, що містить прийнятне похідне карбонової кислоти (1,0 екв.) в органічному розчиннику (такому як ДМФ, ТГФ або CH_2Cl_2), додають EDCI.HCl (1,5 екв.), ГОБТ (1,5 екв.) і N-етил-N-ізопропілпропан-2-амін (3 екв.). Після перемішування протягом близько 10 хв при приблизно 25°C, додають прийнятний амін (1,5 екв.), і реакційну суміш перемішують протягом ще 8-12 год (переважно, 12 год.). Відділену при додаванні води тверду речовину збирають фільтрацією і сушать у вакуумі з отриманням похідного аміду. Необов'язково отримана сполука може бути очищена кристалізацією, або розтиранням з прийнятного розчинника або розчинників, або препаративною ВЕРХ або флеш-хроматографією.

Ілюстративний приклад загальної методики-G:

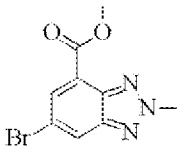
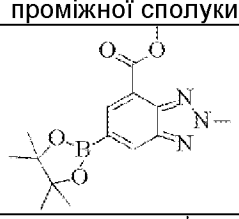
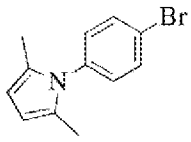
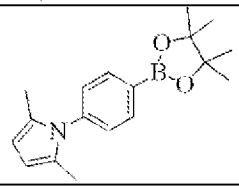
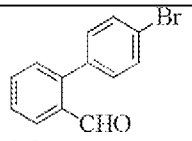
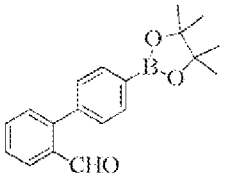
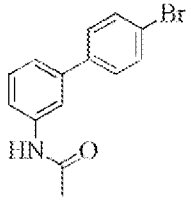
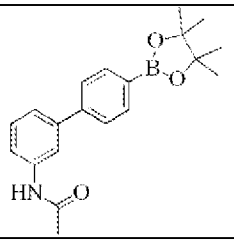
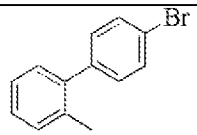
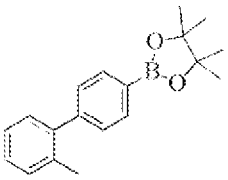
Приклад 2: Синтез 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксамід (сполука-2)



У колбу, що містить 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-біфеніл]-4-іл)-1H- бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбонову кислоту (0,150 г, 0,43 ммоль, сполука-1) в ДМФ (3 мл), додають EDCI.HCl (0,100 г, 0,52 ммоль), ГОБТ (0,070 г, 0,52 ммоль) і N-етил-N-ізопропілпропан-2-амін (0,168 г, 1,31 ммоль). Суміш перемішують при близько 25°C протягом приблизно 10 хв і додають хлорид амонію (0,070 г, 1,31 ммоль). Реакційну суміш потім перемішують додатково протягом близько 12 год. і гасять водою (50 мл). Відділену тверду речовину збирають фільтрацією і сушать у вакуумі з отриманням бажаної сполуки у вигляді білуватої твердої речовини (0,08 г, 53%); ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,47 (с, 1H), 8,37 (с, 1H), 8,05 (с, 1H), 8,00 (с, 1H), 7,90-7,88 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,51-7,49 (д, J=7,6 Гц, 2H), 7,35-7,27 (м, 4H), 4,61 (с, 3H), 2,30 (с, 3H) і РХ-МС m/z=343,2 $(M+H)^+$.

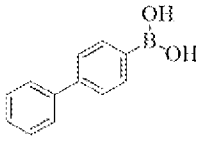
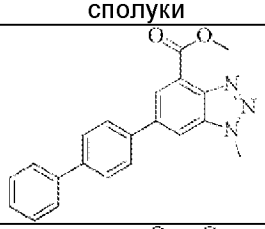
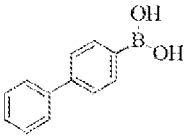
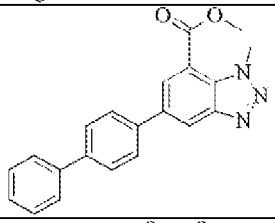
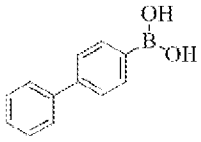
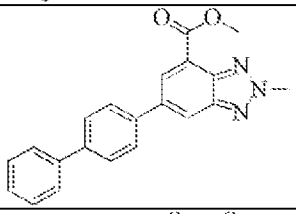
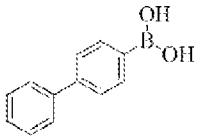
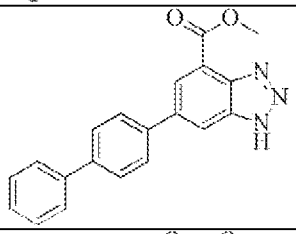
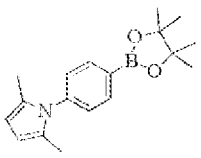
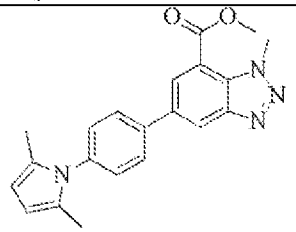
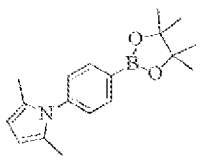
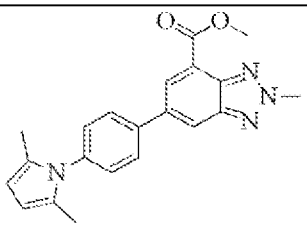
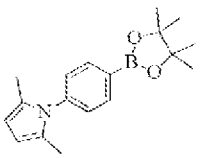
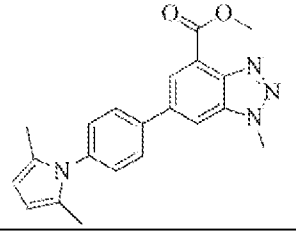
Наведені нижче проміжні сполуки отримують за методикою, що є аналогічною до описаної в загальній методиці-C, з відповідною зміною реагентів, кількостей реагентів і умов реакції. Фізико-хімічні характеристики сполук підсумовані нижче в Таблиці C.1.

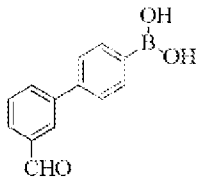
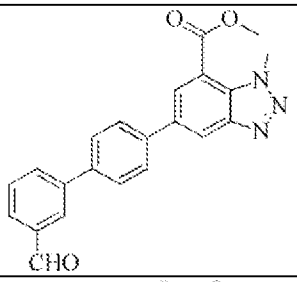
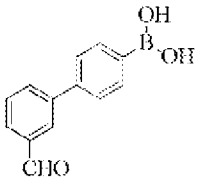
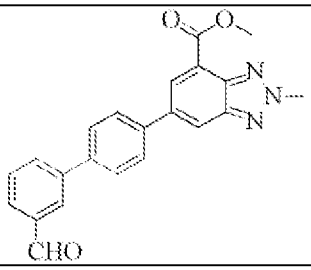
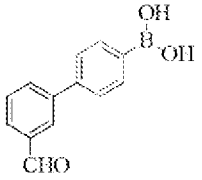
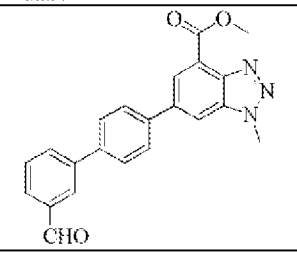
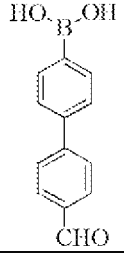
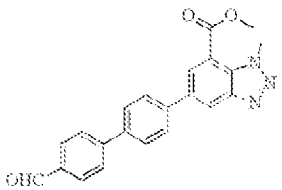
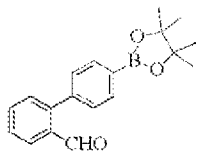
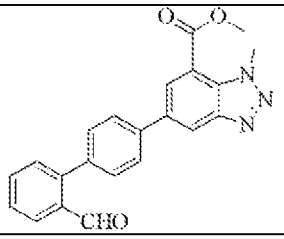
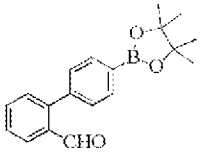
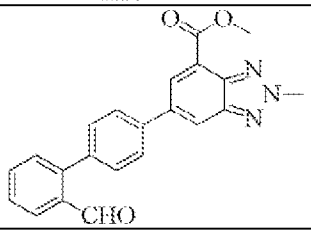
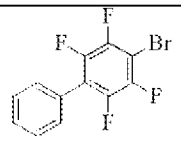
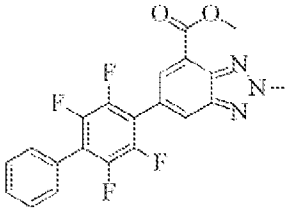
Таблиця С.1.

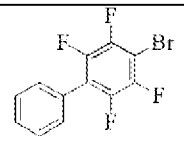
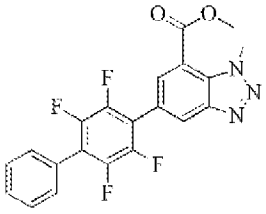
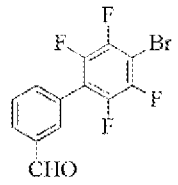
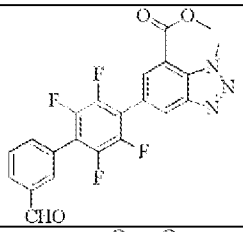
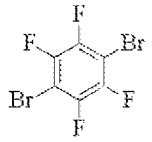
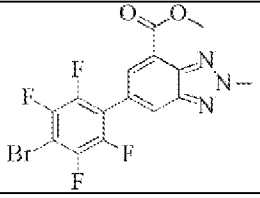
Пр. Спол. №	Реагент/ джерело	Структура проміжної сполуки	Аналітичні дані
С.1.1			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,46 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 4,59 (с, 3H), 3,94 (с, 3H), 1,35 (с, 12H) і РХ-МС m/z=318,2 $(M+H)^+$.
С.1.2			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 7,80-7,78 (д, J=8 Гц, 2H), 7,27-7,25 (д, J=8 Гц, 2H), 5,80 (м, 2H), 1,96 (с, 6H), 1,31 (с, 12H) і РХ-МС m/z=298,2 $(M+H)^+$.
С.1.3	 JOC, 2008, vol, 73, # 14 p. 5558-65		^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 9,88 (с, 1H), 7,94 (д, J=7,2 Гц, 1H), 7,81-7,75 (м, 3H), 7,63-7,45 (м, 4H), 1,32 (с, 12H) і РХ-МС m/z=298,2 $(M+H)^+$.
С.1.4	 EP1970377		^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 10,04 (с, 1H), 7,92-7,91 (д, J=4 Гц, 1H), 7,83-7,58 (м, 4H), 7,41-7,33 (м, 2H), 2,06 (с, 3H), 1,31 (с, 12H) і РХ-МС m/z=338,2 $(M+H)^+$.
С.1.5	 Synlett, 2005, # 11, p. 1775-78.		^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,87-7,85 (д, J=8 Гц, 2H), 7,35-7,33 (д, J=8 Гц, 2H), 7,26-7,24 (м, 4H), 2,26 (с, 3H), 1,36 (с, 12H) і РХ-МС m/z=295,2 $(M+H)^+$.

Наведені нижче проміжні сполуки отримують за методикою, що є аналогічною до описаної в загальній методиці-D, з відповідною зміною реагентів, кількостей реагентів і умов реакції. Фізико-хімічні характеристики сполук підсумовані нижче в Таблиці D.1.

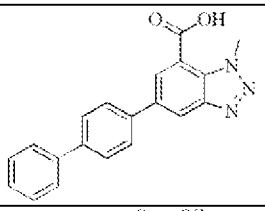
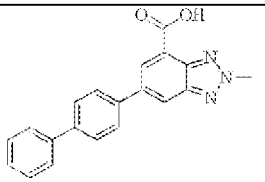
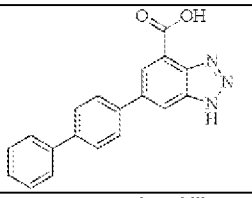
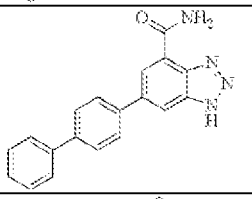
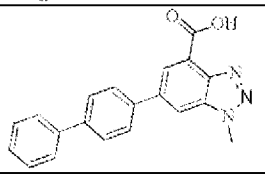
Таблиця D.1.

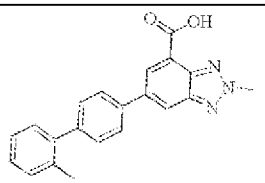
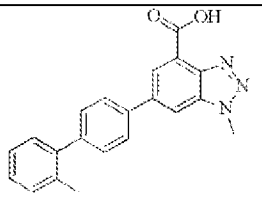
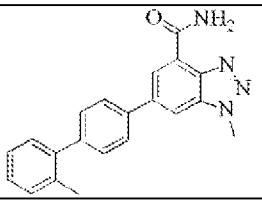
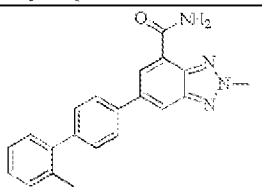
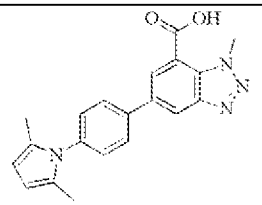
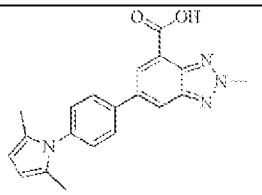
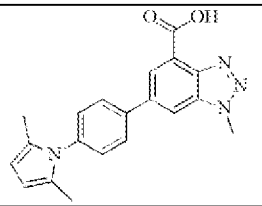
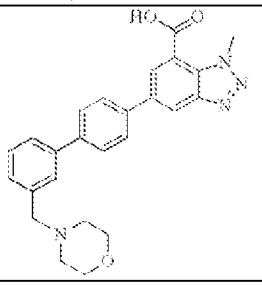
Пр. Спол. №	Реагент/ джерело	Структура проміжної сполуки	Аналітичні дані
D.1.1			^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,50 (с, 1H), 8,30 (с, 1H), 7,79-7,65 (м, 6H), 7,48-7,38 (м, 3H), 4,62 (с, 3H), 4,08 (с, 3H) і РХ-МС m/z=344 $(M+H)^+$.
D.1.2			^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,48-8,46 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,78-7,65 (м, 6H), 7,48-7,37 (м, 3H), 4,62 (с, 3H), 4,04 (с, 3H) і РХ-МС m/z=344 $(M+H)^+$.
D.1.3			РХ-МС m/z=344 $(M+H)^+$.
D.1.4			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 16,05 (с, 1H), 8,73 (с, 1H), 8,42 (с, 1H), 7,94-7,92 (д, J=8 Гц, 2H), 7,84-7,82 (д, J=8 Гц, 2H), 7,76-7,74 (м, 2H), 7,53-7,38 (м, 3H), 4,03 (с, 3H) і РХ-МС m/z=330,2 $(M+H)^+$.
D.1.5			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,69 (с, 1H), 8,41 (с, 1H), 7,96-7,94 (д, J=8 Гц, 2H), 7,41-7,39 (д, J=8 Гц, 2H), 5,8 (с, 2H), 4,50 (с, 3H), 4,00 (с, 3H), 2,02 (с, 6H) і РХ-МС m/z=361,2 $(M+H)^+$.
D.1.6			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,58 (с, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,95-7,93 (д, J=8 Гц, 2H), 7,41-7,39 (д, J=8 Гц, 2H), 5,83 (с, 2H), 4,59 (с, 3H), 4,00 (с, 3H), 2,02 (с, 6H) і РХ-МС m/z=361,1 $(M+H)^+$.
D.1.7			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,57 (с, 1H), 8,39 (с, 1H), 7,95-7,93 (д, J=8 Гц, 2H), 7,41-7,39 (д, J=8 Гц, 2H), 5,83 (с, 2H), 4,59 (с, 3H), 4,00 (с, 3H), 2,02 (с, 6H) і РХ-МС m/z=361,2 $(M+H)^+$.

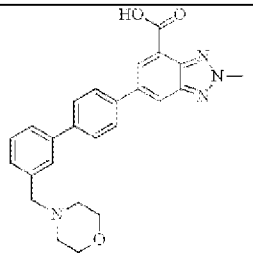
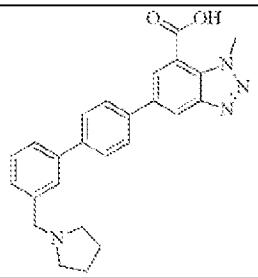
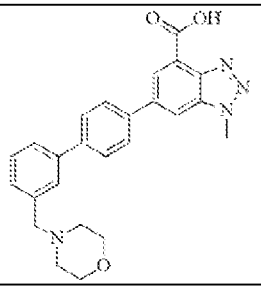
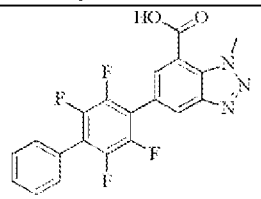
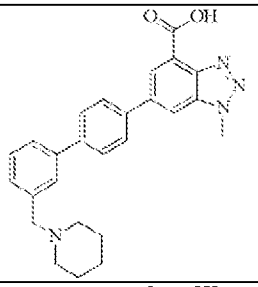
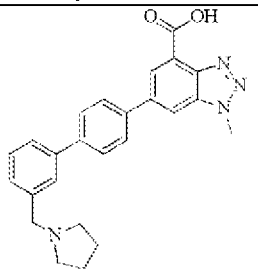
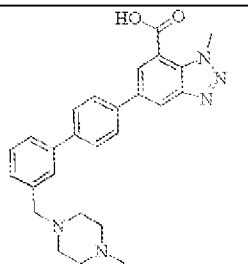
D.1.8			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 10,13 (с, 1H), 8,71 (с, 1H), 8,41 (с, 1H), 8,29 (с, 1H), 8,12-8,10 (д, J=8 Гц, 1H), 7,994-7,905 (м, 5H), 7,75-7,72 (м, 1H), 4,49 (с, 3H), 4,00 (с, 3H) і РХ-МС m/z=372,1 $(M+H)^+$.
D.1.9			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 10,13 (с, 1H), 8,60 (с, 1H), 8,42 (с, 1H), 8,3 (с, 1H), 8,13-8,11 (д, J=8 Гц, 1H), 7,99-7,92 (м, 5H), 7,76-7,72 (м, 1H), 4,60 (с, 3H), 4,01 (с, 3H) і РХ-МС m/z=372,2 $(M+H)^+$.
D.1.10			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 10,14 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 8,14-8,12 (д, J=8 Гц, 1H), 8,031-7,93 (м, 5H), 7,77-7,73 (м, 1H), 4,43 (с, 3H), 4,01 (с, 3H) і РХ-МС m/z=372,2 $(M+H)^+$.
D.1.11			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 10,08 (с, 1H), 8,72 (с, 1H), 8,42 (с, 1H), 8,04-7,92 (м, 8H), 4,49 (с, 3H), 4,00 (с, 3H) і РХ-МС m/z=372,1$(M+H)^+$.
D.1.12			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 9,98 (с, 1H), 8,73 (с, 1H), 7,99-7,97 (м, 3H), 7,82-7,80 (м, 1H), 7,784-7,61 (м, 4H), 4,50 (с, 3H), 4,00 (с, 3H) і РХ-МС m/z=372,1 $(M+H)^+$.
D.1.13			^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 9,98 (с, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,43 (с, 1H), 7,98-7,96 (м, 3H), 7,80-7,79 (м, 1H), 7,64-7,59 (м, 4H), 4,60 (с, 3H), 3,98 (с, 3H) і РХ-МС m/z=372,2 $(M+H)^+$.
D.1.14	 Organic Letters, 2009, vol. 11, # 15, p. 3346-49.		^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,30-8,28 (м, 2H), 7,54-7,50 (м, 5H), 4,65 (с, 3H), 4,07 (с, 3H) і РХ-МС m/z=416,1 $(M+H)^+$.

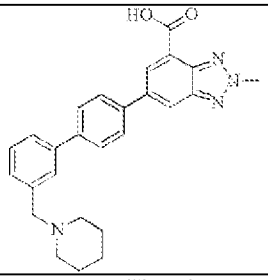
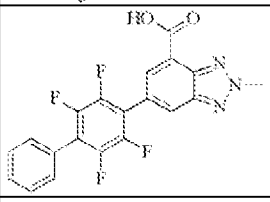
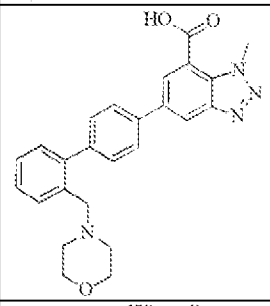
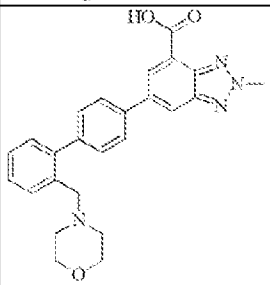
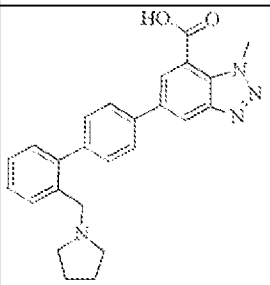
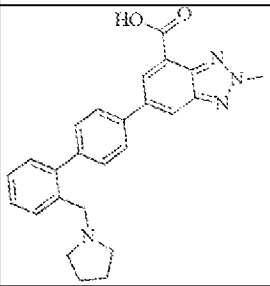
D.1.15	 Organic Letters, 2009, vol. 11, # 15 p. 3346-49.		РХ-МС m/z=416,1 $(M+H)^+$.
D.1.16			^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 10,12 (с, 1Н), 8,67 (с, 1Н), 8,26 (с, 1Н), 8,13-8,11 (м, 2Н), 7,96-7,83 (м, 2Н), 4,53 (с, 3Н), 4,0 (с, 3Н); РХ-МС m/z=444,1 $(M+H)^+$.
D.1.17			^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,52 (с, 1Н), 8,37 (с, 1Н), 4,64 (с, 3Н), 4,10 (с, 3Н); РХ-МС m/z=418 $(M+H)^+$.

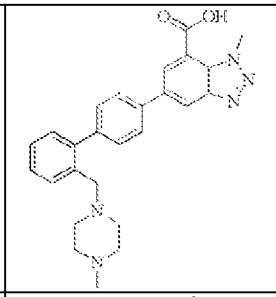
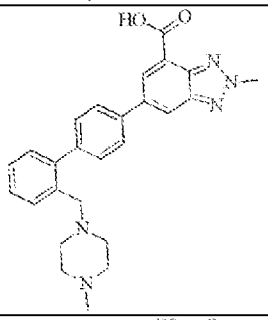
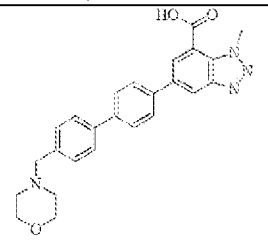
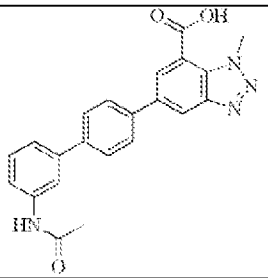
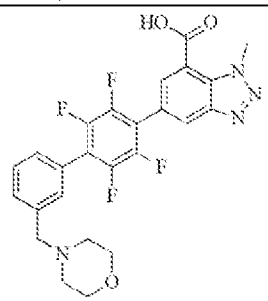
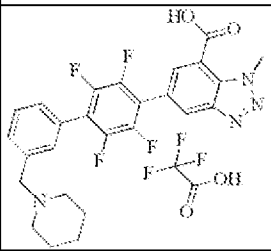
Наведені нижче проміжні сполуки отримують за методикою, що є аналогічною до описаної в загальній методиці-E, F і G, з відповідною зміною реагентів, кількостей реагентів і умов реакції. Фізико-хімічні характеристики сполук підсумовані нижче в Таблиці.

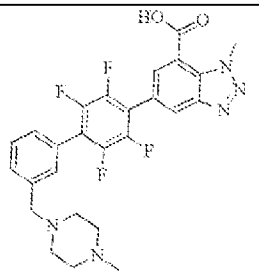
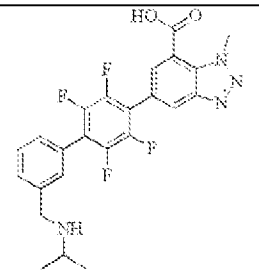
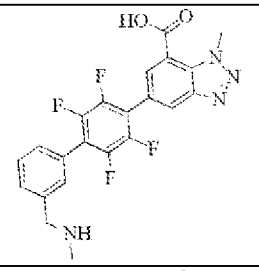
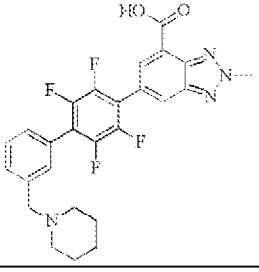
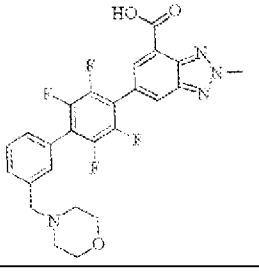
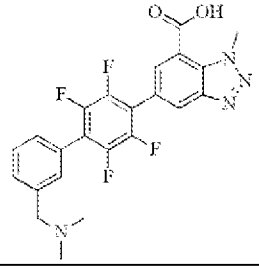
Спол. №	Структура	Загальна методика	Аналітичні дані
3		F	^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,34 (шс, 1Н), 8,53 (с, 1Н), 8,38 (с, 1Н), 7,93-7,91 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,84-7,82 (д, J=8,8 Гц, 2Н), 7,76-7,74 (д, J=7,6 Гц, 2Н), 7,53-7,40 (м, 3Н), 4,58 (с, 3Н) і РХ-МС m/z=330,1 $(M+H)^+$.
4		F	^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,34 (шс, 1Н), 8,51 (с, 1Н), 8,28 (с, 1Н), 7,97-7,95 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,87-7,85 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,78-7,76 (д, J=7,6 Гц, 2Н), 7,53-7,41 (м, 3Н), 4,42 (с, 3Н) і РХ-МС m/z=330,1 $(M+H)^+$.
5		F	^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,34 (шс, 1Н), 8,64 (с, 1Н), 8,43 (с, 1Н), 7,92 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,86 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,76 (д, J=7,2 Гц, 2Н), 7,55-7,41 (м, 3Н) і РХ-МС m/z=316,1 $(M+H)^+$.
6		F і G	^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 15,9 (шс, 1Н), 8,61 (с, 1Н), 8,48 (с, 1Н), 8,41 (с, 1Н), 7,98 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,84 (д, J=8 Гц, 2Н), 7,77-7,75 (m 3Н), 7,52-7,38 (м, 3Н) і РХ-МС m/z=315,1 $(M+H)^+$.
7		F	^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,9 (шс, 1Н), 8,63 (с, 1Н), 8,39 (с, 1Н), 7,94-7,92 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,83-7,81 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,76-7,74 (д, J=7,2 Гц, 2Н), 7,52-7,40 (м, 3Н), 4,52 (с, 3Н) і РХ-МС m/z=330,1 $(M+H)^+$.

8		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,39 (шс, 1H), 8,50 (с, 1H), 8,28 (с, 1H), 7,93-7,91 (д, J=7,6 Гц, 2H), 7,54-7,52 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,35-7,27 (м, 4H), 4,41 (с, 3H) 2,30 (с, 3H) і РХ-МС m/z=344,1 $(M+H)^+$.
9		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,64 (с, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,90-7,88 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,51-7,49 (д, J=7,6 Гц, 2H), 7,32-7,27 (м, 4H), 4,52 (с, 3H) 2,30 (с, 3H) і РХ-МС m/z=344,2 $(M+H)^+$.
10		G	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,54 (с, 1H), 8,49 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,93 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,54 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,34-7,28 (м, 4H), 4,45 (с, 3H), 2,30 (с, 3H) і РХ-МС m/z=343,2 $(M+H)^+$.
11		F і G	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,54 (с, 1H), 8,49 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,93-7,91 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,54-7,52 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,34-7,28 (м, 4H), 4,45 (с, 3H), 2,30 (с, 3H) і РХ-МС m/z=343,2 $(M+H)^+$.
12		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,8 (шс, 1H), 8,67 (с, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,97 (д, J=8 Гц, 2H), 7,42 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,83 (с, 2H), 4,52 (с, 3H), 2,03 (с, 6H) і РХ-МС m/z: 347,2 $(M+H)^+$.
13		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,38 (шс, 1H), 8,56 (с, 1H), 8,37 (с, 1H), 7,96 (д, J=8 Гц, 2H), 7,42 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,83 (с, 2H), 4,58 (с, 3H), 2,03 (с, 6H) і РХ-МС m/z: 347,2 $(M+H)^+$.
14		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,38 (шс, 1H), 8,53 (с, 1H), 8,27 (с, 1H), 7,98 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,45 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,84 (с, 2H), 4,41 (с, 3H), 2,03 (с, 6H) і РХ-МС m/z: 347,2 $(M+H)^+$.
15		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,38 (шс, 1H), 8,62 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 7,93 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,82 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,67-7,63 (м, 3H), 7,48-7,44 (м, 1H), 7,35 (д, J=8 Гц, 1H), 4,5 (с, 3H), 3,61 (м, 6H), 2,43 (м, 4H) і РХ-МС m/z: 429,2 $(M+H)^+$.

16		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,38 (шс, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 7,93 (д, J=8 Гц, 2H), 7,83 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,67-7,64 (м, 2H), 7,48-7,45 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,36 (д, J=8 Гц, 1H), 4,58 (с, 3H), 3,60 (м, 6H), 2,43 (м, 4H) і РХ-МС m/z: 429,2 $(M+H)^+$.
17		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 11,82 (шс, 1H), 8,20 (с, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,83-7,61 (м, 6H), 7,44 (т, J=7,6 Гц, 2H), 7,34 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,54 (с, 3H), 3,74 (с, 2H), 1,74 (м, 4H), 1,23 (м, 4H) і РХ-МС m/z: 413,2 $(M+H)^+$.
18		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,2 (шс, 1H), 8,49 (с, 1H), 8,27 (с, 1H), 7,96 (д, J=8 Гц, 2H), 7,85 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,67-7,64 (м, 2H), 7,48-7,46 (м, 1H), 7,44-7,34 (м, 1H), 4,44 (с, 3H), 3,60-3,57 (м, 6H), 2,41 (м, 4H) і РХ-МС m/z=429,2 $(M+H)^+$.
19		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,8 (шс, 1H), 8,60 (с, 1H), 7,59 (с, 1H), 7,65-7,55 (м, 5H), 4,45 (с, 3H) і РХ-МС m/z=402,1 $(M+H)^+$.
20		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,37 (с, 1H), 8,20 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,71-7,66 (м, 5H), 7,50-7,46 (м, 1H), 7,38-7,37 (м, 1H), 4,45 (с, 3H), 3,88 (с, 2H), 2,80-2,65 (м, 4H), 1,72-1,61 (м, 4H), 1,458 (м, 2H) і РХ-МС m/z=427,3 $(M+H)^+$.
21		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 12,2 (шс, 1H), 8,34 (с, 1H), 8,21 (с, 1H), 7,91-7,81 (м, 4H), 7,70-7,63 (м, 2H), 7,46-7,36 (м, 2H), 4,40 (с, 3H), 3,73 (с, 2H), 3,45-3,40 (м, 4H), 1,80-1,65 (м, 4H) і РХ-МС m/z=413,3 $(M+H)^+$.
22		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 12,2 (шс, 1H), 8,58 (с, 1H), 8,35 (с, 1H), 7,92 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,81 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,67-7,65 (м, 2H), 7,49-7,45 (м, 1H),7,35-7,33 (м, 1H), 4,52 (с, 3H), 3,65 (с, 2H), 2,87-2,67 (м, 4H), 2,62-2,56 (м, 4H), 2,50 (с, 3H) і РХ-МС m/z=442,3 $(M+H)^+$.

23		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 12,36 (шс, 1H), 8,51 (м, 1H), 8,37 (с, 1H), 7,92-7,80 (м, 4H), 7,68-7,64 (м, 2H),7,48-7,44 (м, 1H), 7,35-7,33 (м, 1H), 4,58 (с, 3H), 3,63 (с, 2H), 2,56-2,45 (м, 4H), 1,54-1,23 (м, 6H) і РХ-МС m/z=427,3 $(M+H)^+$.
24		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,33 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,59-7,45 (м, 5H), 4,59 (с, 3H) і РХ-МС m/z=402,1 $(M+H)^+$.
25		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,67 (с, 1H), 8,43 (с, 1H), 7,96-7,94 (м, 3H), 7,54-7,50 (м, 4H), 7,41-7,40 (м, 1H), 4,53 (с, 3H),4,38 (шс, 2H), 3,77-3,72 (м, 4H), 3,15 (м, 2H), 2,82 (м, 2H) і РХ-МС m/z=429,3 $(M+H)^+$.
26		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,36 (с, 1H), 8,56 (с, 1H), 8,41 (с, 1H), 7,95 (д, J=8 Гц, 2H), 7,81 (м, 1H), 7,59-7,51 (м, 4H), 7,44-7,42 (м, 1H), 4,59 (с, 3H), 4,40 (шс, 2H), 3,82-3,72 (м, 4H), 3,18 (м, 2H), 2,82 (м, 2H) і РХ-МС m/z=429,3 $(M+H)^+$.
27		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,78 (шс, 1H), 8,67 (с, 1H), 8,42 (с, 1H), 8,04 (м, 1H), 7,97 (д, J=8 Гц, 2H), 7,53-7,40 (м, 4H), 7,39-7,38 (м, 1H), 4,52 (с, 3H), 4,39 (с, 2H), 3,4 (м, 2H), 2,79 (м, 2H), 1,81 (м, 4H) і РХ-МС m/z=413,2 $(M+H)^+$.
28		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,36 (с, 1H), 8,56 (с, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,96 (д, J=8 Гц, 2H), 7,91-7,89 (м, 1H),7,55-7,39 (м, 5H), 4,59 (с, 3H), 4,41 (с, 2H), 3,32 (м, 2H), 2,81 (м, 2H), 1,81 (м, 4H) і РХ-МС m/z=413,3 $(M+H)^+$.

29		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,21 (с, 1H), 8,66 (с, 1H), 8,42 (с, 1H), 7,92 (д, J=8 Гц, 2H), 7,55 (д, J=8 Гц, 2H), 7,47 (м, 2H), 7,37 (м, 2H), 4,52 (с, 3H), 3,56 (с, 2H), 3,40 (м, 2H), 3,14 (м, 4H), 2,74 (с, 3H) і РХ-МС m/z=442,3 $(M+H)^+$.
30		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,26 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,92 (д, J=8 Гц, 2H),7,56 (д, J=8 Гц, 2H), 7,48 (м, 2H), 7,38 (м, 2H), 4,59 (с, 3H), 3,93 (м, 2H), 3,44-3,42 (м, 4H), 3,16-3,14 (м, 4H), 2,77 (с, 3H) і РХ-МС m/z=442,3 $(M+H)^+$.
31		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,63 (с, 1H), 8,39 (с, 1H), 7,92 (д, J=8 Гц, 2H), 7,82 (д, J=8 Гц, 2H), 7,73 (д, J=8 Гц, 2H), 7,45 (д, J=8 Гц, 2H), 4,52 (с, 3H), 3,61 (м, 6H), 2,74-2,61 (м, 4H) і РХ-МС m/z=429,3 $(M+H)^+$.
32		F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,8 (шс, 1H), 10,06 (с, 1H), 8,63 (д, J=1,6 Гц, 1H), 8,38 (д, J=1,6 Гц, 1H), 7,98-7,93 (м, 3H), 7,75 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,61-7,58 (м, 1H), 7,42-7,40 (м, 2H), 4,52 (с, 3H), 2,05 (с, 3H) і РХ-МС m/z=387,1 $(M+H)^+$.
33		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,98 (шс, 1H), 8,63 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,78-7,70 (м, 4H), 4,55 (с, 3H), 4,53 (с, 2H), 3,93-3,79 (м, 4H), 3,21 (м, 4H) і РХ-МС m/z=501,2 $(M+H)^+$.
34		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 8,39 (с, 1H), 8,07 (с, 1H), 7,65-7,54 (м, 4H), 4,54 (с, 3H), 3,87 (с, 2H), 2,68 (м, 4H), 1,63 (м, 4H), 1,47 (м, 2H) і РХ-МС m/z=499,2 $(M+H)^+$.

35		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 12,4 (шс, 1H), 8,4 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,51-7,49 (м, 4H), 4,55 (с, 3H), 3,63 (с, 3H), 2,74-2,67 (м, 6H), 2,25-2,22 (м, 4H) і РХ-МС m/z=514,2 $(M+H)^+$.
36		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 9,8 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 7,90 (с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,64-7,53 (м, 3H), 4,53 (с, 3H), 4,24 (с, 2H), 3,36-3,16 (м, 1H), 1,34 (д, J=6,4 Гц, 6H) і РХ-МС m/z=473,2 $(M+H)^+$.
37		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,98 (шс, 1H), 8,95 (с, 1H), 8,63 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,71-7,65 (м, 4H), 4,55 (с, 3H), 4,26 (с, 2H), 2,63 (с, 3H) і РХ-МС m/z=445,1 $(M+H)^+$.
38		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,46 (шс, 1H), 8,53 (с, 1H), 8,19 (с, 1H), 7,82-7,69 (м, 4H), 4,62 (с, 3H), 4,37 (с, 2H), 2,88-2,66 (м, 2H), 1,79-1,68 (м, 5H), 1,38-1,23 (м, 2H) і РХ-МС m/z=499,2 $(M+H)^+$.
39		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,48 (шс, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,19 (с, 1H), 7,81-7,72 (м, 4H), 4,62 (с, 3H), 4,46 (с, 2H), 3,98 (м, 2H), 3,78-3,72 (м, 2H), 3,15 (м, 4H) і РХ-МС m/z=501,2 $(M+H)^+$.
40		E і F	^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ 13,8 (шс, 1H), 8,62 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,78-7,70 (м, 4H), 4,55 (с, 3H), 4,38 (с, 2H), 2,75 (с, 6H) і РХ-МС m/z=459,2 $(M+H)^+$.

ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Вимірювання активності, що інгібує фермент ДГОДГ (аналізи in vitro)

Аналіз активності ДГОДГ являє собою зв'язаний ферментний аналіз, в якому окиснення ДГО і подальше відновлення убіхінону є стехіометрично еквівалентним відновленню DCIP (2,6-дихлорфенолу). Відновлення DCIP супроводжується втратою абсорбції при 610 нм.

Отримання розчинів/реагенту:

Отримання буфера: 50 мМ тріс HCl, 150 мМ KCl і pH 8,0, 0,8% тритон.

Вихідний розчин L-дигідрооротової кислоти 20 мМ в буфері.

Вихідний розчин гідрату натрієвої солі 2,6-дихлориндофенолу 20 мМ в буфері.

Вихідний розчин децилубіхінону 20 мМ в буфері.

ДМСО застосовують як носій.

Методика

5 мкл диметилсульфоксиду або сполуки формули (I) в розчині ДМСО додають в ямку 96-ямкового планшету. Сполуку формули (I) вимірюють при 10 мкМ.

Додають білок разом з буфером так, щоб загальний об'єм, включаючи ДМСО, становив 87 мкл. Сполуку і білок інкубують протягом півгодини при кімнатній температурі після змішування. 5 мкл 20 мМ розчину L-дигідрооротової кислоти, 5 мкл 2 мМ розчину децилубіхінону і 3 мкл 2 мМ розчину гідрату натрієвої солі 2,6-дихлориндофенолу додають до отриманого вище розчину (загальний аналітичний об'єм 100 мкл). Суміш перемішують протягом 2 хв., і абсорбцію записують кожні 10 хв. при 610 нанометрах.

Процент інгібування розраховують таким чином:

100*{(Abs_{610} для реакційної суміші, що містить сполуку) - (Abs_{610} для позитивного контролю)}/{(Abs_{610} для реакційної суміші без ферменту) - (Abs_{610} для позитивного контролю)}

Реакційна суміш, що містить сполуку, містить сполуку, буфер, фермент і субстрат.

Позитивний контроль містить ДМСО, буфер, фермент і субстрат.

Реакційна суміш без ферменту містить ДМСО, буфер і субстрат.

Визначення IC_{50}

Готують 2 мМ вихідний розчин ДМСО вибраних тризаміщених похідних бензоімідазолу і бензотриазолу формули (I) відповідно до даного винаходу для дослідження. Потім проводять розведення 1/3.

5 мкл кожного вихідного розчину сполуки формули (I) застосовують для кожного 100 мкл аналізу. Отже, 5 мкл 2 мМ вихідного розчину дають 100 мкл 100 мкМ розчину сполуки формули (I) при розведенні буфером, білком і субстратом. Див. також: Ulrich et al. (2001) Eur. J. Biochem, 268, 1861-1868.

Значення IC_{50} вибраних сполук відповідно до даного винаходу представлені в таблиці нижче, сполуки, що демонструють значення IC_{50} ≤0,1 мкМ групують як ‘a’, сполуки, що демонструють значення IC_{50} в інтервалі від 0,101 мкМ до 1,0 мкМ групують як ‘b', і сполуки, що демонструють значення IC_{50} >1,0 мкМ групують як ‘c'.

Таблиця

інгібувальна дія на ДГОДГ вибраних сполук

Група	Сполука №№
a	1, 2, 8, 12, 19, 24.
b	3, 4, 11, 13, 25, 29, 33, 34, 36, 38, 39, 40.
c	15, 16, 17, 20, 26, 27, 30, 31, 32, 35, 37.

КЛІТИННА АКТИВНІСТЬ

Аналіз проліферації Ramos (аналізи In vitro)

Аналіз проліферації клітин є чутливим способом кількісного визначення життєздатних клітин в аналізі цитотоксичності або проліферації. Система XTT (внутрішньої солі 2,3-біс[2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл]-2H-тетразолій-5-карбоксіаніліду) є засобом вимірювання активності живих клітин через мітохондріальні дегідрогенази. Мітрохондріальні дегідрогенази живих клітин розщеплюють тетразолієве кільце XTT з отриманням оранжевих кристалів формазону, які розчинні у водних розчинах. Розчин XTT потенціюють додаванням електронного поєднуючого агента, метосульфату феназину (МСФ) в реакційну суміш. Отриманий оранжевий колір спектрофотометрично вимірюють при 450 нм. Підвищення або зниження кількості клітин дає супутню зміну кількості формазону, що утворився, показуючи ступінь цитотоксичності, викликаної продуктом, що тестується.

Отримання розчинів/реагенту

Отримання середовища

Розчиняють 17,7 г порошку IMDM (середовища Дульбекко в модифікації Іскова), 1,5 г бікарбонату натрію, pH 7,2-7,4, в 1 л води MiliQ, додають 1% пеніцилін/стрептоміцин і 10% ФТС.

Розчиняють 10,6 г порошку Ham's F12, 1,5 г бікарбонату натрію, pH 7,2-7,4, в 1 л води MiliQ, додають 1% пеніциліну/стрептоміцину.

ДМСО застосовують як носій.

1× ФРФБ (фізіологічний розчин з фосфатним буфером): розчиняють 5 таблеток ФРФБ (Sigma: Cat#P4417) в 1 л води MiliQ.

Методика (визначення IC_{50})

Клітини Ramos ресуспендують до щільності 1×10^5 клітин/мл в повному середовищі IMDM. 95 мкл цієї суспензії додають в 96-ямковий планшет для висівання ~10000 клітин на ямку. Планшети інкубують при 37°C в зволоженій атмосфері 5% CO_2 протягом ~1 години до додавання сполуки.

Тестовані сполуки (див. таблицю 1) розчиняють в 100% ДМСО з отриманням 2/6/10/20 мМ вихідного розчину. 200× концентрацію необхідної кінцевої концентрації готують в ДМСО. 10 мкл кожної концентрації (200×) потім розводять в 90 мкл середовища Ham's F12, що не містить сироватки, з отриманням проміжної концентрації 20× в середовищі. Концентрація ДМСО на цій стадії становить 10% (проміжне розведення). 5 мкл кожного проміжного розведення потім додають тричі в попередньо засіяний 96-ямковий планшет. Кінцева концентрація ДМСО становить 0,5% в експериментальній ямці. Клітини, оброблені 0,5% ДМСО, служать позитивним контролем. 100 мкл повного середовища IMDM служать масовою пробою для аналізу даних. 200 мкл 1× ФРФБ додають у всі кутові ямки аналітичного планшета. Планшети потім інкубують протягом 72 год в інкубаторі з 5% CO_2 при 37°C.

У день закінчення 100 мкл розчину XTT (1 мг/мл XTT з доданням 25 мкМ МСФ в середовищі Ham's F12) додають в кожну ямку. Планшети інкубують протягом 2 год. Кількість отриманого формазону визначають зчитуванням абсорбції планшета із застосуванням багатоканального планшетного рідера VICTOR X5 при довжині хвилі 450 нм. Значення IC_{50} визначають як концентрації, які знижують життєздатність клітин на 50%, і криві будують за допомогою GraphPad Prism 6.0.

Процент інгібування розраховують таким чином:

Процент інгібування (%) розраховують нормалізацією контрольних значень ДМСО до 100% із застосуванням формули:

$$\%\ \text{інгібування}=100\% - (Abs450_{\text{тестована сполука-проба}})/(Abs450_{\text{позитивний контроль-проба}})*100$$

Тестована сполука містить клітини, тестовану сполуку, середовище IMDM і 0,5% ДМСО

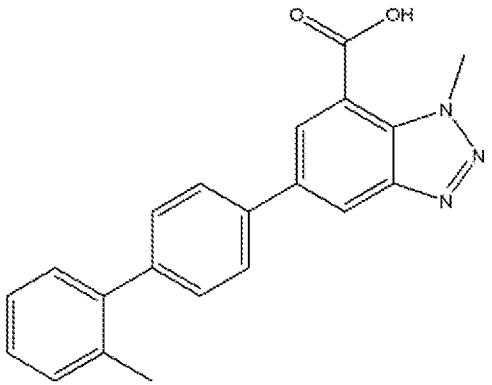
Позитивний контроль містить клітини, середовище IMDM і 0,5% ДМСО

Проба містить середовище IMDM

Спол. №	Максимальний % інгібування при 30 мкМ	IC_{50} (мкМ)
1	107	0,049
2	95	1,086
3	113	0,524
4	107	1,453
8	103	0,154
11	67 (при 10 мкМ)	НО
12	103	0,362
13	100	3,882
15	96	8,406
16	124	6,141
17	50	НО
19	106	0,07
20	129	3,717
24	104	0,4
25	120	2,819
26	133	4,255
27	89	3,05
29	81	8,968
30	56	НО
31	81 (при 10 мкМ)	1,349
32	74	14,58
34	111 (при 10 мкМ)	0,675
38	92	1,601
39	96	1,869
40	84	11,85

In vitro інгібування росту множини колоній клітин раку людини сполукою 1

Проводять скринінг панелі колоній ракових клітин, метою якого є ідентифікація підмножин ракових клітин, які особливо чутливі до інгібування ДГОДГ сполукою 1. Сполуку 1 представлено наступною структурною формулою:



Ці колонії клітин обробляють сполукою 1 протягом всього 72 годин.

Оцінка швидкості росту пухлини через 72 години обробки, показана на фіг. 1 і в таблиці 1, показала, що певна підмножина колоній клітин (зображена сірими крапками на фіг. 1) чутлива до сполуки 1. Більшість колоній клітин, що демонструють високу чутливість до сполуки 1, мають гомопоетичне походження, хоча деякі солідні пухлини також демонструють високу чутливість (таблиця 1). Для цілей отримання фіг. 1, чутливі колонії клітин були визначені як такі, що демонструють ≥75% від максимального інгібування росту і такі, що мають значення GI_{50} <1,5 мкМ. У таблиці 1 представлений список деяких чутливих до сполуки 1 колоній клітин разом із значеннями GI_{50} і максимальною реакцією росту. Максимальне інгібування 100 представляє повне інгібування росту; максимальне значення інгібування >100 представляє смерть клітин.

Подальший скринінг проводять на розширеній панелі колоній клітин лінії гема в 4-денному аналізі росту. Ріст оцінюють вимірюваннями Cell-Titer Glo в день 0 і день 4. Як показано на фіг. 2, 25% перевірених гемових колоній (20/80) демонструють чутливість до сполуки 1, з яких колонії дифузної В-великоклітинної лімфоми (ДДВВКЛ) були особливо чутливими (8/11 або 73%). Підмножина гемових колоній, які мали проміжну чутливість (визначену як >50% і <75% інгібування швидкості росту) або відсутність чутливості (визначене як <50% інгібування швидкості росту) до сполуки 1 в цьому подальшому скринінгу, піддають розширеним дослідженням росту для оцінки того, чи змінює збільшений час обробки їх профіль чутливості. Більш конкретно, ці гемові колонії заздалегідь обробляють сполукою 1 протягом трьох днів вказаними концентраціями, і потім повторно висівають на планшети для стандартного 4-денного аналізу росту в свіжому середовищі/лікарському засобі. Переважна більшість повторно тестованих гемових колоній демонстрували сильну чутливість до сполуки 1 через 7 днів лікування сполукою 1 (таблиця 2).

Таблиця 1

GI_{50} і максимальне інгібування росту різних колоній клітин, оброблених сполукою 1

Колонія кліитн	Первинне місце	Захворювання	GI_{50} (мкМ)	Максимальне інгібування росту
OCILY8	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Дифузна В-великоклітинна лімфома	0,02	148,2
SUDHL5	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Дифузна В-великоклітинна лімфома	0,02	117,2
JVM13	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	В-пролімфоцитарний лейкоз	0,02	112,0
MINO	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Мантійноклітинна лімфома	0,03	144,9
SUDHL1	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Анапластична великоклітинна лімфома	0,04	186,5

SR786	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Анапластична великоклітинна лімфома	0,05	96,3
MOLM13	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Гострий мієлоїдний лейкоз	0,06	133,8
RL	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Неходжкінська лімфома	0,08	87,0
DU4475	Молочна залоза	Тричі негативний рак молочної залози	0,10	137,4
JYSE150	Стравохід	Рак стравоходу (плоскоклітинна карцинома стравоходу)	0,10	78,4
KYSE510	Сравохід	Рак стравоходу (плоскоклітинна карцинома стравоходу)	0,13	97,5
SUM159PT	Молочна залоза	Тричі негативний рак молочної залози	0,14	91,2
MV411	Гомопоетична і лімфоїдна тканина	Дитячий гострий мієлоїдний лейкоз	0,27	835
DU145	Простата	Рак простати	0,48	84,9
CJM	Шкіра	Меланома	0,62	77,4

Таблиця 2

4-денна і 7-денна чутливість різних гемових колоній клітин, оброблених сполукою 1

Колонія клітин	Захворювання	Чутливість	
		4-дні	7-днів
REC-1	Мантійноклітинна лімфома	*	***
SUDHL4	Дифузна В-великоклітинна лімфома	**	***
U266B1	Множинна мієлома	*	***
LP1	Множинна мієлома	*	***
MOLP-2	Множинна мієлома	**	***
KG-1	Гострий мієлоїдний лейкоз	*	***
KMS12BM	Множинна мієлома	**	***
ВДХМ	Гострий мієлоїдний лейкоз	**	***
HuNS1	Множинна мієлома	*	***
GDM-1	Гострий мієлоїдний лейкоз	*	**
SKNO-1	Гострий мієлоїдний лейкоз	*	**
Kasumi-3	Гострий мієлоїдний лейкоз	*	*
Kasumi-6	Гострий мієлоїдний лейкоз	*	*
F36P	Гострий мієлоїдний лейкоз	**	***
THP-1	Гострий мієлоїдний лейкоз	**	***
AML-193	Гострий мієлоїдний лейкоз	**	***
TF1	Гострий мієлоїдний лейкоз	*	***
HEL	Гострий мієлоїдний лейкоз	**	***

* - не чутливі
** - проміжні
*** - чутливі

Інгібування росту ракових клітин сполукою 1, що пов'язане з інгібуванням ДГОДГ

ДГОДГ каталізує четверту стадію de novo біосинтезу піримідину, окислюючи дигідрооротат до оротату у внутрішній мембрані мітохондрій. Потім оротат об'єднується з фосфорибозилпірофосфатом (ФРПФ) з утворенням оротидин-5'-монофосфату (ОМФ). Уридин монофосфат (УМФ) в кінцевому результаті отримують з ОМФ в цитозолі, де він використовується для отримання піримідинів для біосинтезу РНК/ДНК, а також для інших важливих функцій біосинтезу, таких як глікозилювання білків/жиру і утворення фосфоліпідів для біосинтезу мембран.

Щоб підтвердити, що вплив сполуки 1 на погіршення росту/життєздатності клітин

зумовлений специфічним інгібування ДГОДГ, були проведені аналізи росту клітин з різними кількостями уридину, доданого в середовище. Додавання в середовище концентрацій уридину, близьких до фізіологічних (5 мкМ), частково відновлює дію сполуку 1, в той час як супрафізіологічні концентрації (25 мкМ і 100 мкМ) повністю відновлюють дію на ріст аж до 10 мкМ сполуки 1. Ці результати показують, що дія сполуки 1 на ріст є цільовою (фіг. 3).

Порівняння профілю чутливості сполуки 1 до профілів чутливості до цитарабіну і доксорубіцину

Профіль чутливості сполуки 1 для підмножини гемових колоній порівнюють з профілями чутливості інших агентів, які використовуються як стандарт медичної допомоги (СМД) при злоякісних новоутвореннях гема. Відповідно зі своїм відмінним механізмом дії, сполука 1 продемонструвала профіль чутливості (фіг. 4A), відмінний від профілів чутливості до цитарабіну (фіг. 4B) і доксорубіцину (фіг. 4C).

Сполука 1 ефективно інгібує ДГОДГ in vivo і блокує ріст пухлини в моделі ксенотрансплантату ОМЛ

Дослідження in vivo ефективності сполуки 1 проводять для оцінки трансляції дії на блокаду ДГОДГ і інгібування росту пухлинних клітин від in vitro до in vivo. 1×10^6 клітини MOLM-13 імплантують підшкірно мишам CB17 SCID. Мишей (n=15/група) обробляють носієм або сполукою 1 в дозі 100 мг/кг ДРС ПО як тільки пухлини досягають в середньому ~150 мм^3. У кінці дослідження тканини збирають у вказані моменти часу після останньої дози для аналізу фармакокінетики (ФК) і біомаркера шляху.

Сполука 1, що вводиться в дозі 100 мг/кг ДРС, добре переноситься і дає практично повне інгібування росту пухлини (ІРП) в моделі ксенотрансплантату MOLM-13 гострого мієлоїдного лейкозу (ОМЛ) (фіг. 5A). Фармакокінетичний профіль вимірюють в плазмі, і пухлина показує падіння концентрацій лікарського засобу через 12 год., підтримуючи режим введення ДРС (фіг. 5B). Явним свідченням зв'язування з мішенню є значне підвищення рівнів дигідрооротату (ДГО) в пухлини, субстрат ДГОДГ (фіг. 5C). Базові рівні ДГО були нижче виміряної межі (BQL <120 нг/г). Уридинові пули в пухлині паралельно знижуються на ~60% залежно від моменту часу, що оцінюється (фіг. 5D).

Сполука 1 ефективно інгібує ДГОДГ in vivo і блокує ріст пухлини в моделях ксенотрасплантату отриманих у пацієнтів ОМЛ і ДДВВКЛ

Далі проводять скринінг із застосуванням невеликої кількості мишей в групі для оцінки ефективності сполуки 1 в моделях ксенотрансплантатів отриманих у пацієнтів ОМЛ і ДДВВКЛ. Мишей з пухлиною (n=3/група) обробляють носієм або сполукою 1 в дозі 100 мг/кг ДРС ПО.

Як показано на фіг. 6A-6E і 7A-7B, протипухлинна дія сполуки 1 спостерігається у всіх тестованих моделях, з >60% ІРП в двох з п'яти моделях ОМЛ (i.e., ОМЛ_2 і ОМЛ_5) і однієї з двох моделей ДДВВКЛ (ДДВВКЛ_1). Модель ДДВВКЛ_1 характеризується як триударна модель ДДВВКЛ.

In vitro інгібування росту колоній людських ракових клітин двоударної дифузної В-клітинної лімфоми сполуки 1.

Було виявлено, що три отримані у пацієнтів колонії клітин ДБККЛ лімфоми, класифіковані як двоударна ДДВВКЛ, а саме OCILY18, SC-1 і CARNAVAL, є високо чутливими до інгібування сполукою 1 в 96-год аналізі росту (фіг. 8).

Сполука 1 ефективно блокує ріст пухлини в моделі ксенотрансплантату отриманої у пацієнта ДДВВКЛ

Сильне блокування in vivo росту пухлини спостерігається для сполуки 1 в моделі ксенотрансплантату OCILY-19 дифузної В-великоклітинної лімфоми (ДДВВКЛ). 7×10^6 клітин OCILY-19 імплантують підшкірно мишам CB17 SCID. Мишей (n=15-18/групу) обробляють носієм або сполукою 1 у вказаній дозі/частоті як тільки пухлини досягають в середньому ~150 мм^3. Тканини збирають у вказані моменти часу після останньої дози для аналізів ФК і біомаркеру.

Ступінь модулювання шляху і інгібування росту пухлини продемонструвала залежність від дози і схеми (фіг. 9A). Схема введення 100 мг/кг ДРС дає чудову ефективність в порівнянні з дозами 10 і 30 мг/кг ДРС, і це корелює зі значним збільшенням ДГО в пухлині (фіг. 9C), а також зі зниженням загальної кількості уридинових пулів в пухлині (фіг. 9D). Схема 200 мг/кг ОРС була менш ефективною, ніж схема введення 100 мг/кг ДРС через короткий період напіввиведення сполуки 1 у мишей, що дає більш низькі мінімальні концентрації препарату при введенні ОРС (див. фіг. 9B).

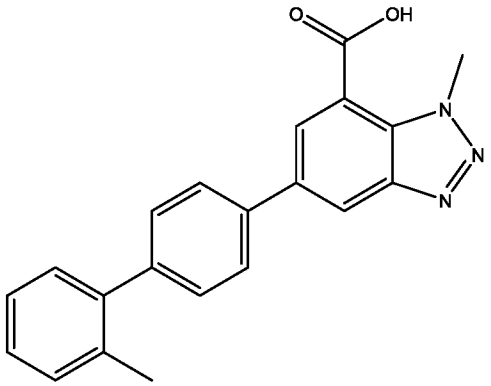
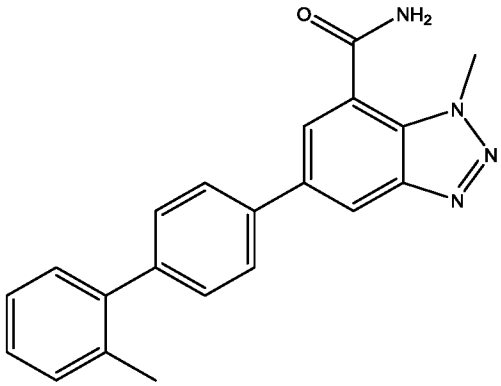
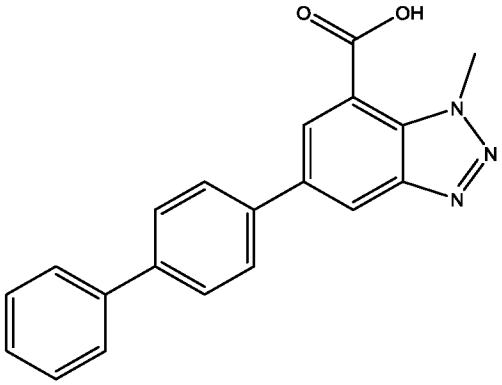
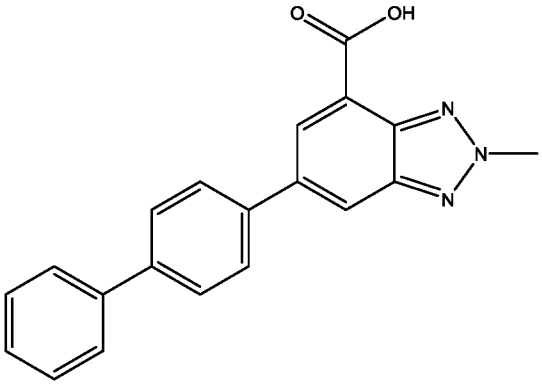
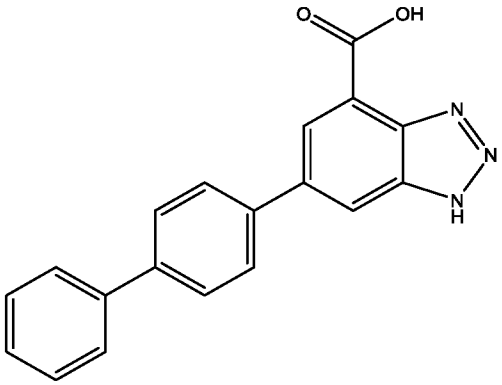
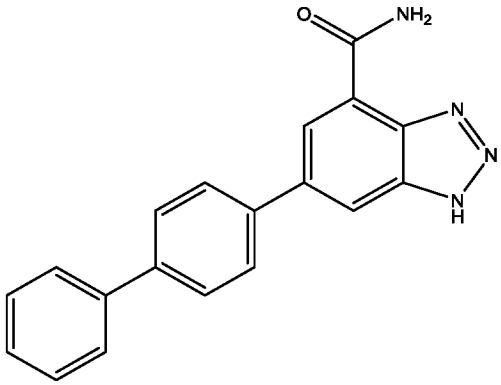
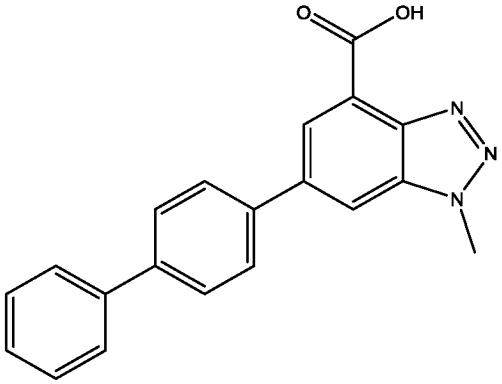
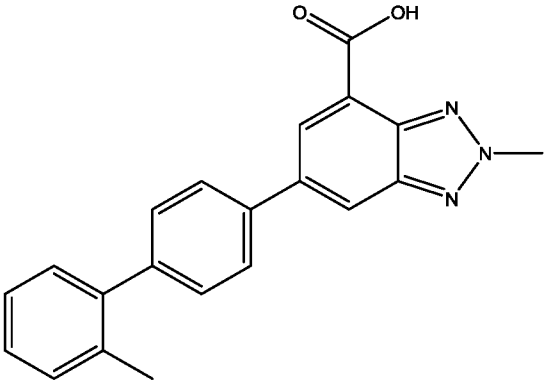
In vitro інгібування росту множини колоній клітин тричі негативного рака молочної залози сполукою 1

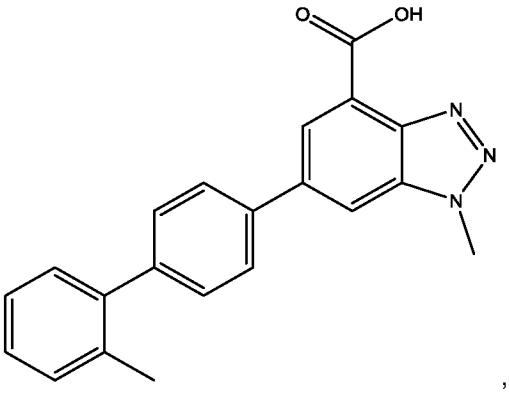
Панель колоній клітин тричі негативного раку молочної залози (THPM3) піддають скринінгу для оцінки того, чи може бути лікування сполукою 1 як єдиним агентом сприятливим для

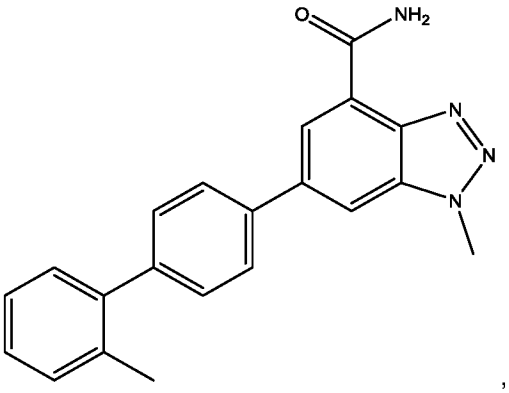
підмножини THPM3. Лікування сполукою 1 протягом 96 годин сильно погіршує життєздатність/ріст клітин в DU4475 до порівнянного ступеню, що спостерігається в колоніях клітин гемового походження (див. фіг. 10), хоч чотири інші колонії THPM3 (HCC1143, HCC38, BTS49 і HCC1806) були не чутливі в умовах тестування.

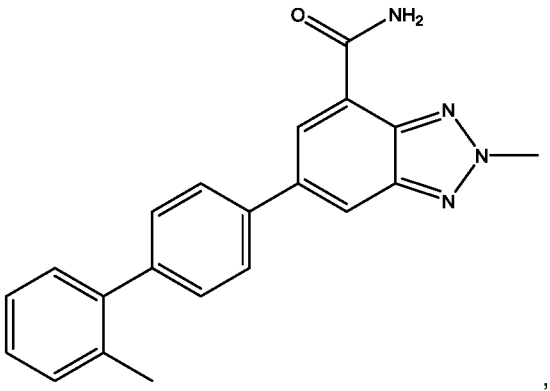
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

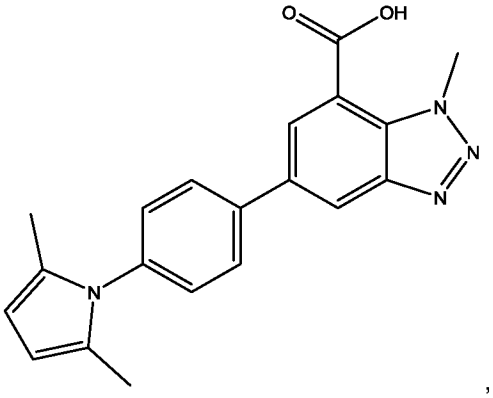
1. Сполука, вибрана з:

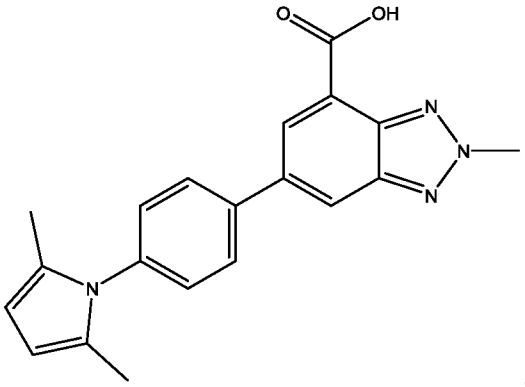

,

,

,

,

,

,

,

,

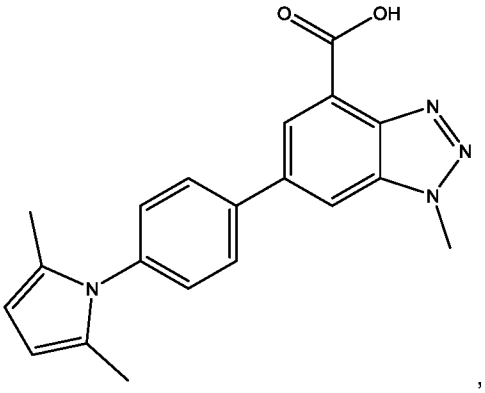

,

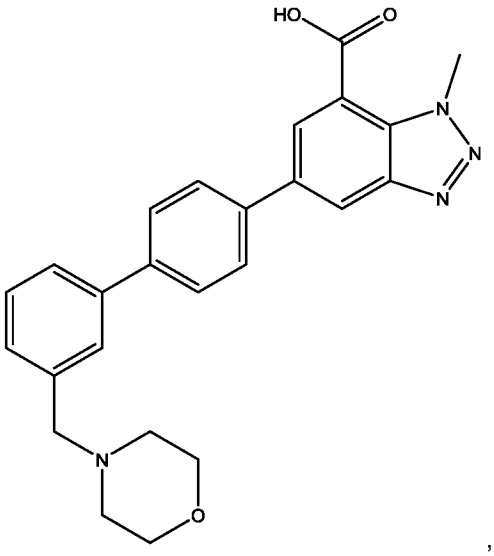

,

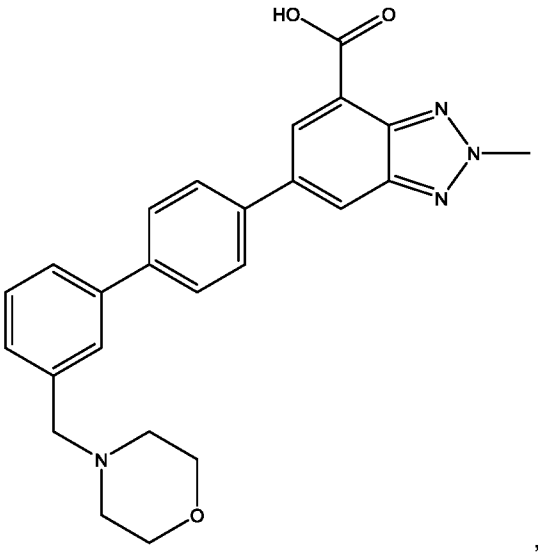

,

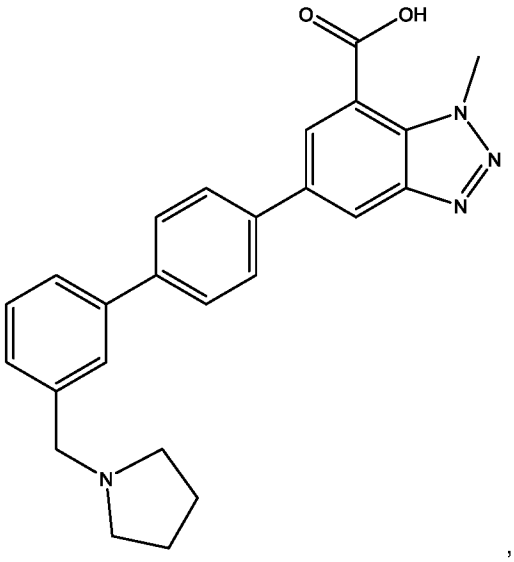

,


,

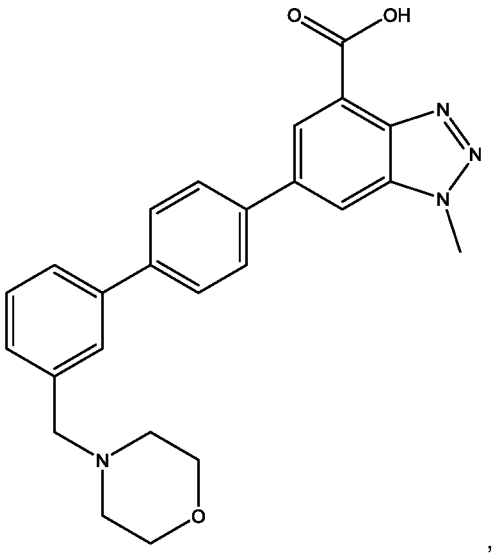

,


,

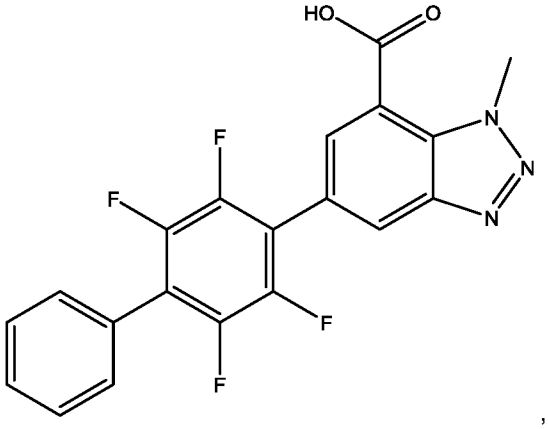

,



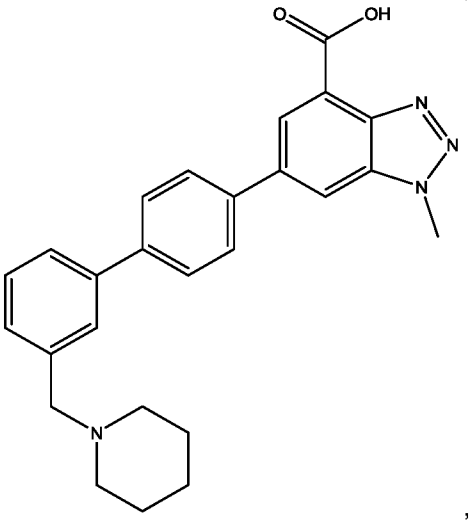
,



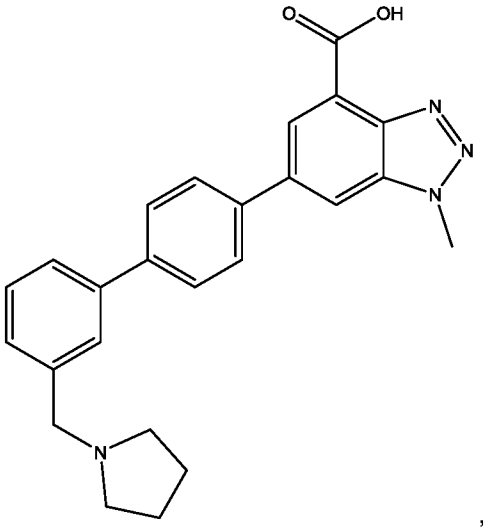
,



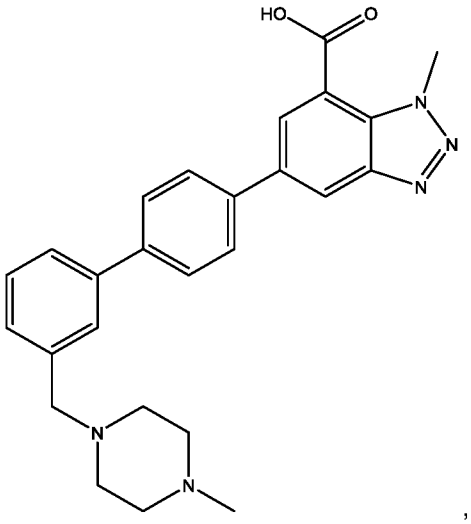
,



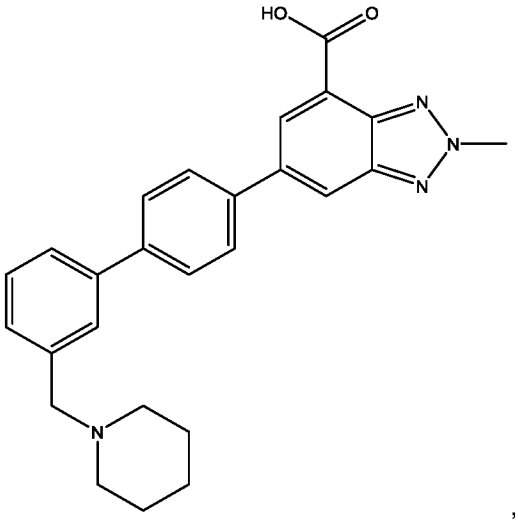
,



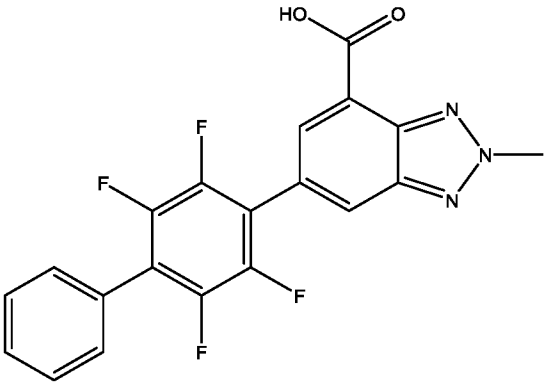
,



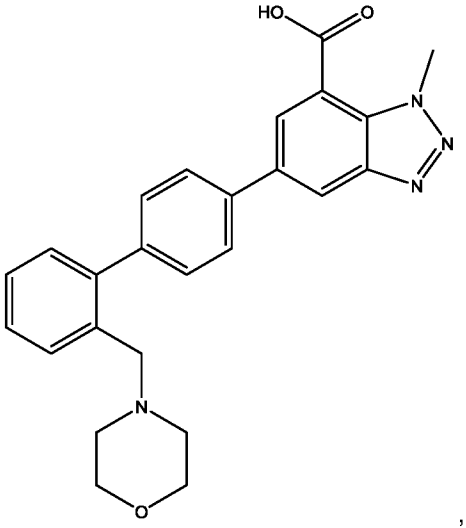
,


HO
O
N
N
N
N

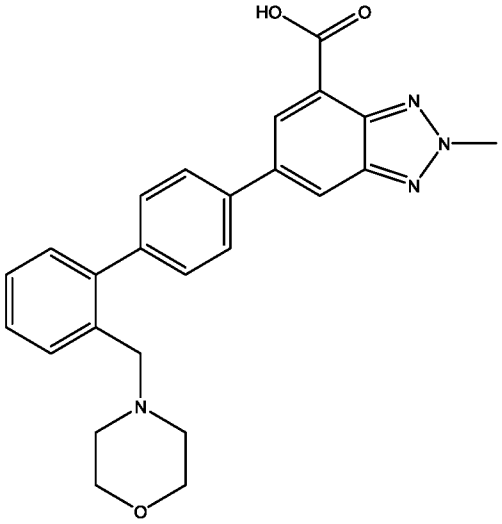
,


HO
O
F
F
F
F
N
N
N

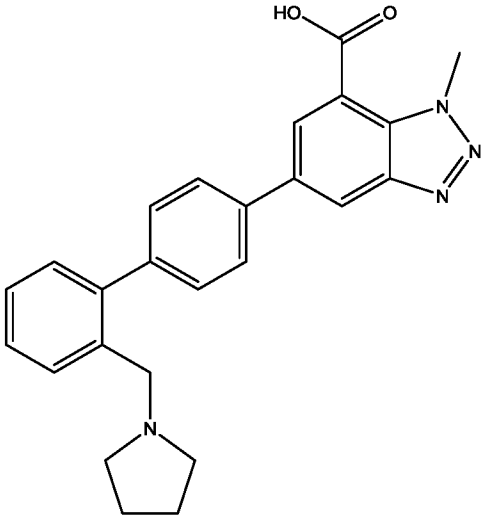
,


HO
O
N
N
N
N
O

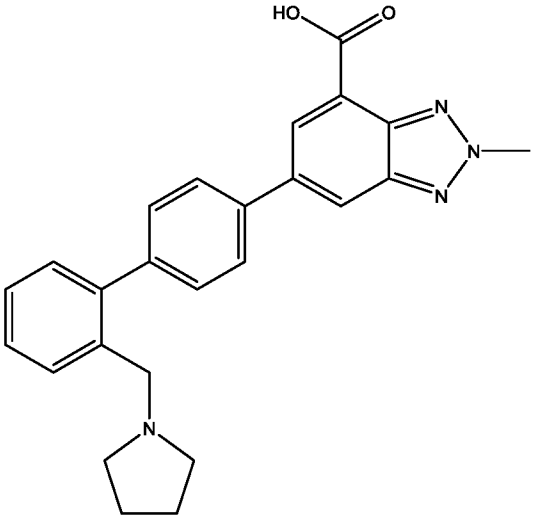
,


HO
O
N
N
N
N
O

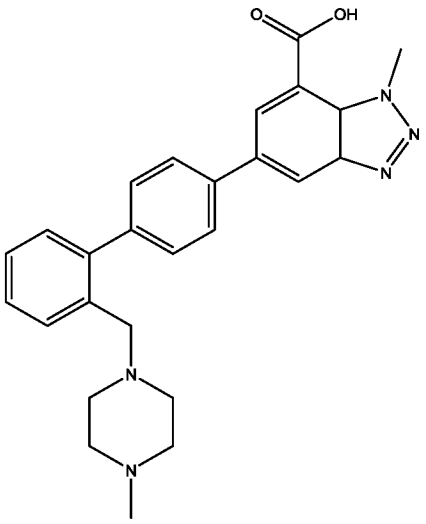
,


HO
O
N
N
N
N

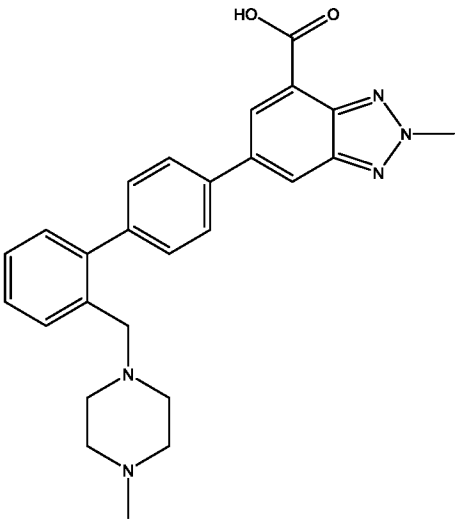
,


HO
O
N
N
N
N

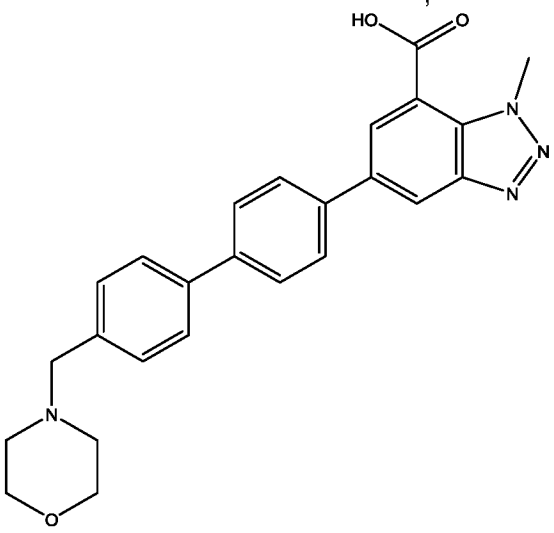
,



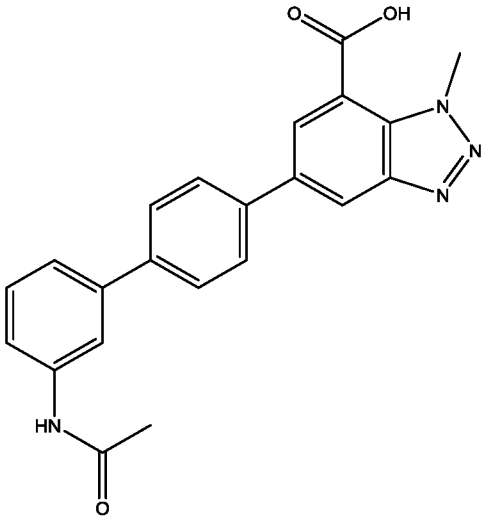
,



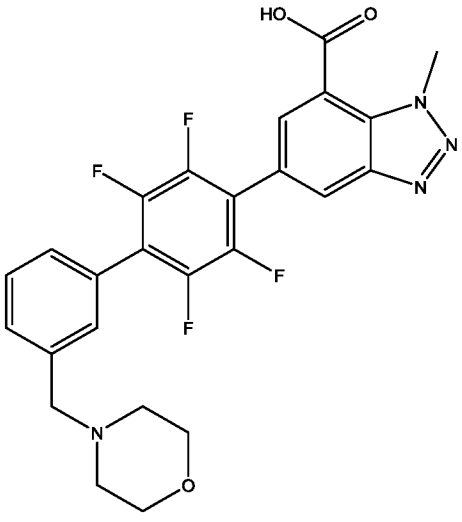
,



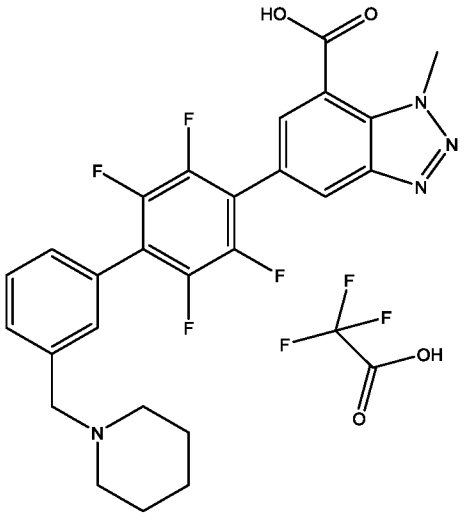
,



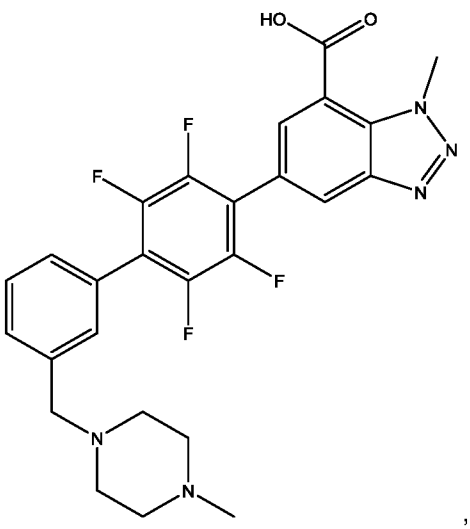
,



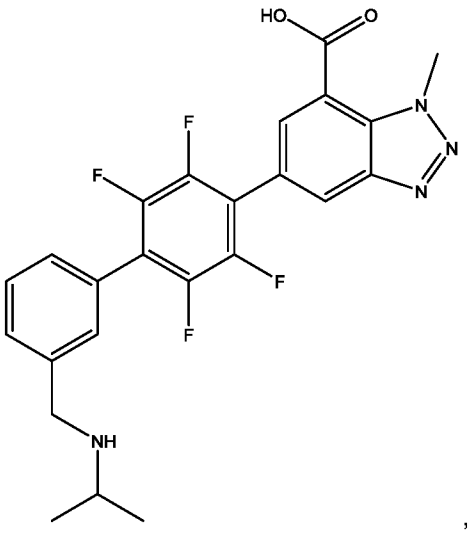
,



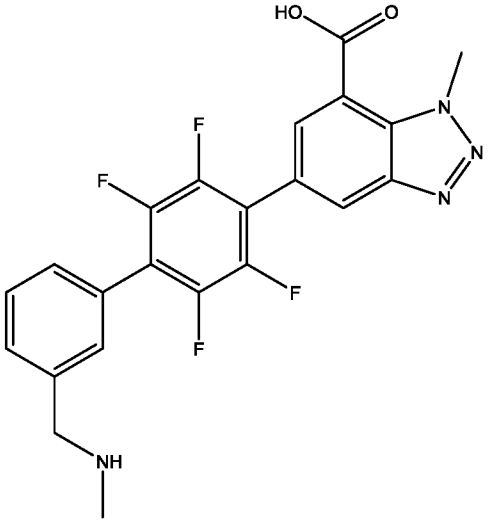
,



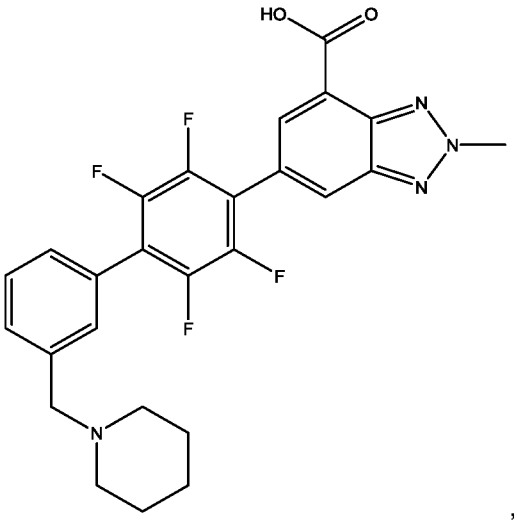
,



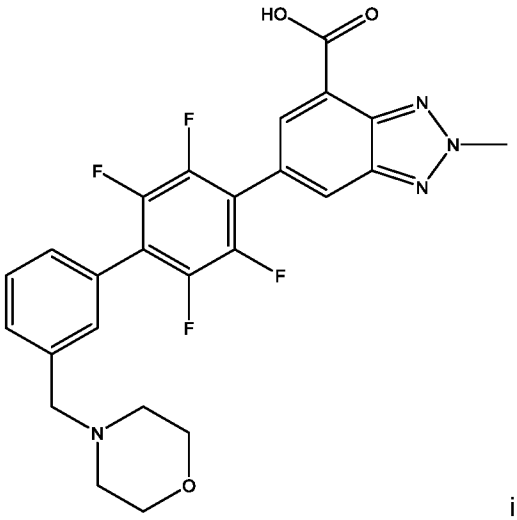
,



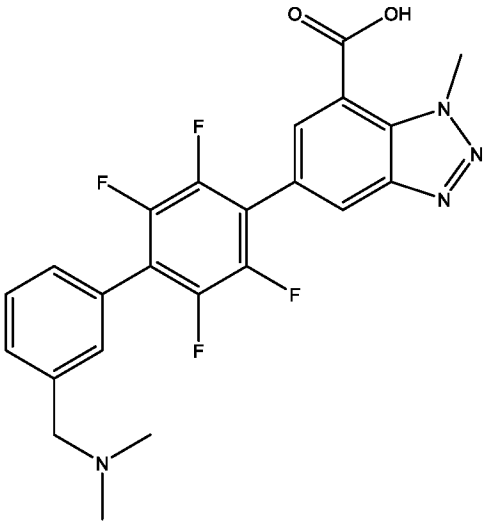
,



,



і



,

або її фармацевтично прийнятна сіль,

для застосування в лікуванні раку, вибраного з гострого мієлоїдного лейкозу, множинної мієломи, В-пролімфоцитарного лейкозу, гострого лімфобластного лейкозу, хронічного лімфолейкозу, хвороби Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, фолікулярної лімфоми, дифузної В-великоклітинної лімфоми, анапластичної великоклітинної лімфоми, мантійноклітинної лімфоми, тричі негативного раку молочної залози, меланоми, раку простати або раку стравоходу, у суб'єкта.

2. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є гострий мієлоїдний лейкоз.

3. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є множинна мієлома.

4. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п.1, де раком є В-пролімфоцитарний лейкоз.

5. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є неходжкінська лімфома.

6. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є дифузна В-великоклітинна лімфома.

7. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 6, де дифузною В-великоклітинною лімфомою є двоударна дифузна В-великоклітинна лімфома.

8. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 6, де дифузною В-великоклітинною лімфомою є триударна дифузна В-великоклітинна лімфома.

9. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є анапластична великоклітинна лімфома.

10. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є мантійноклітинна лімфома.

11. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є тричі негативний рак молочної залози.

12. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є меланома.

13. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є рак простати.

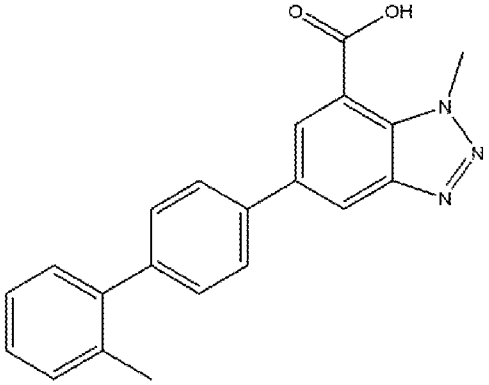
14. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є рак стравоходу.

15. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є хвороба Ходжкіна.

16. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є хронічний лімфолейкоз.

17. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за п. 1, де раком є фолікулярна лімфома.

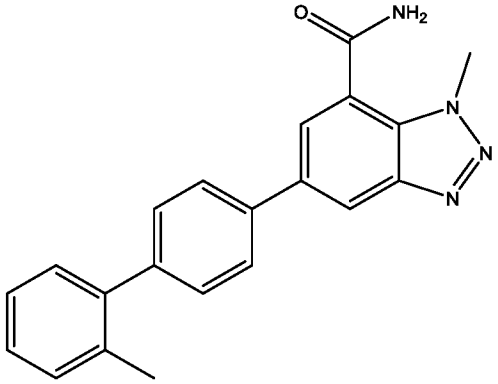
18. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-17, де сполукою є:



,

або її фармацевтично прийнятна сіль.

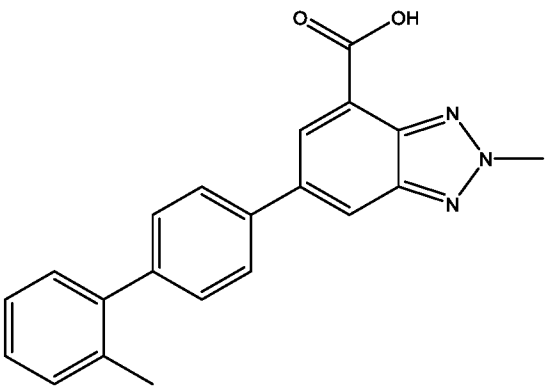
19. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-17, де сполукою є:



,

або її фармацевтично прийнятна сіль.

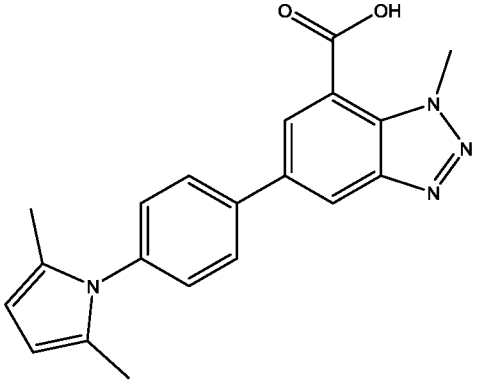
20. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-17, де сполукою є:



,

або її фармацевтично прийнятна сіль.

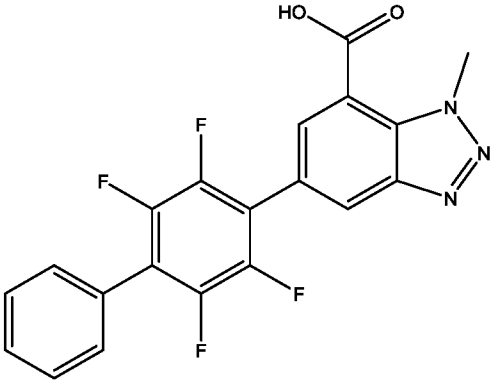
21. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-17, де сполукою є:



,

або її фармацевтично прийнятна сіль.

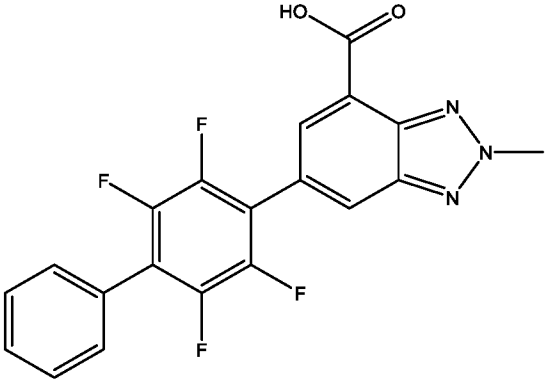
22. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-17, де сполукою є:



,

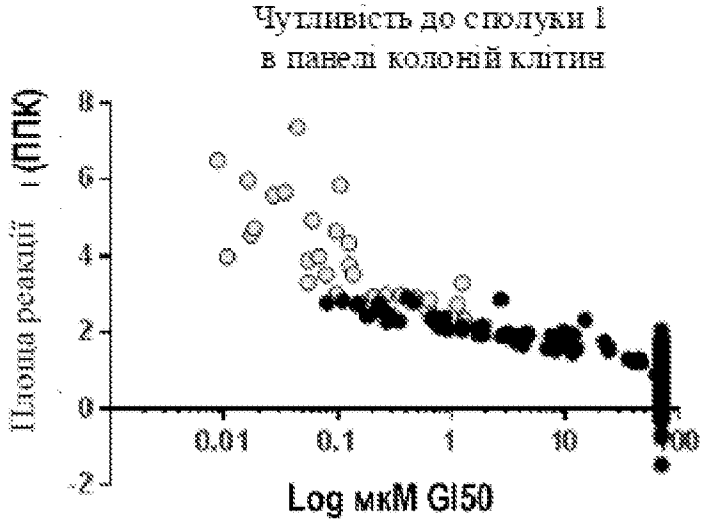
або її фармацевтично прийнятна сіль.

23. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-17, де сполукою є:

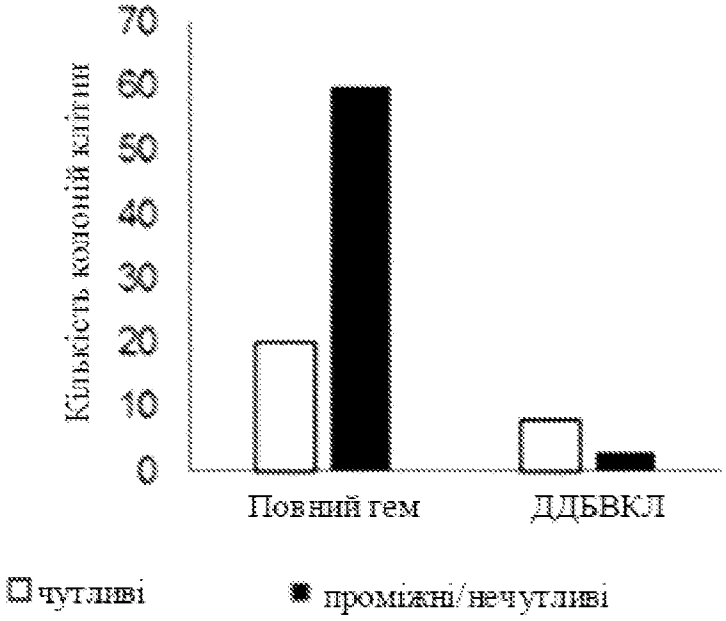


,

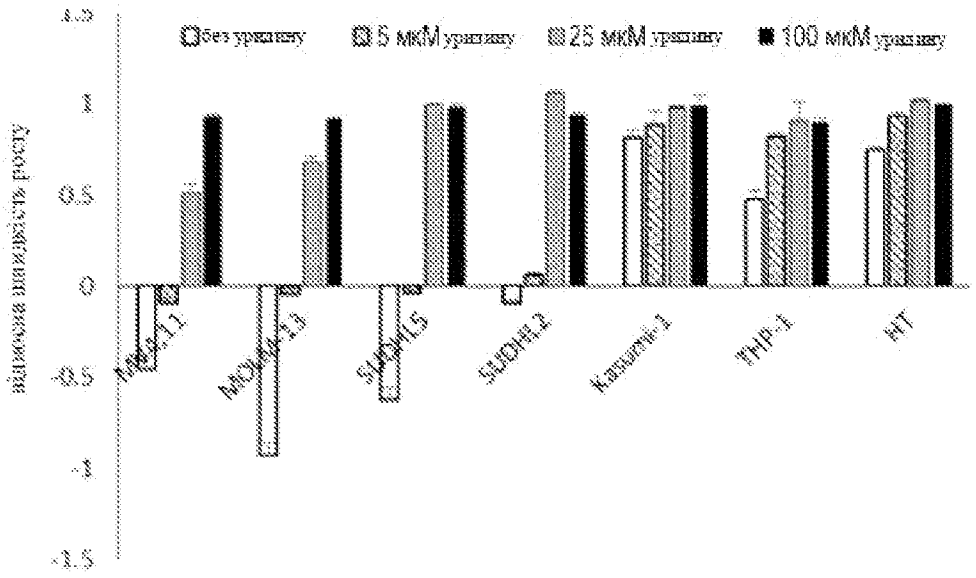
або її фармацевтично прийнятна сіль.


Чутливість до сполуки 1
в панелі колоній клітин
Площа реакції (ППК)
8
6
4
2
0
-2
0.01
0.1
1
10
100
Log мкМ GI50

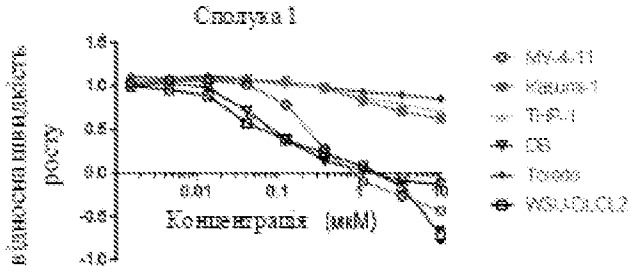
Фіг. 1


Кількість колоній клітин
70
60
50
40
30
20
10
0
Повний гем
ДДБВКЛ
чутливі
проміжні/нечутливі

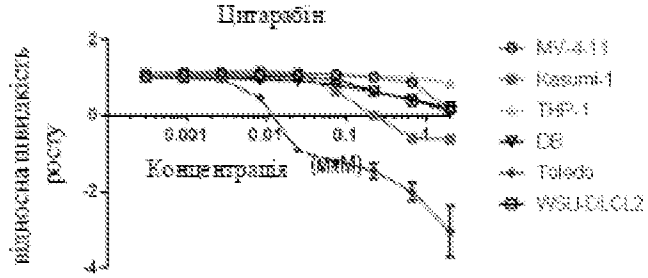
Фіг. 2



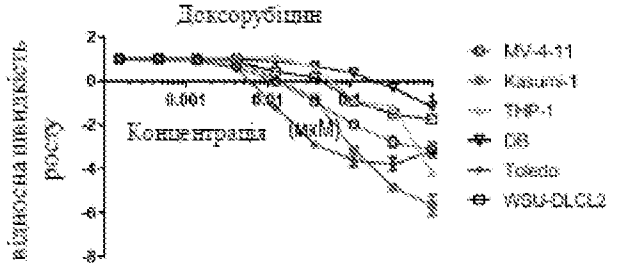
Фіг. 3



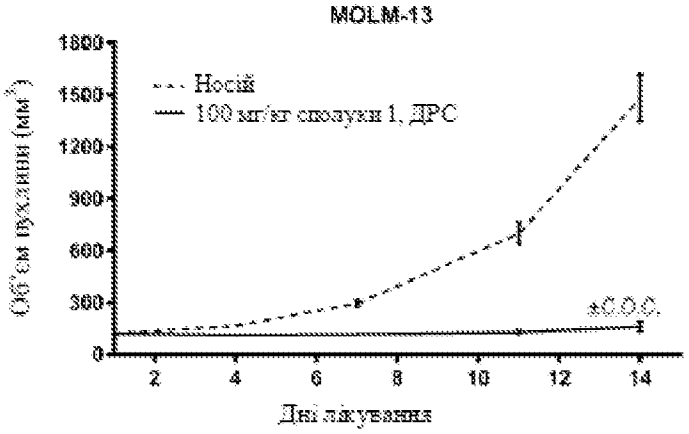
Фіг. 4A



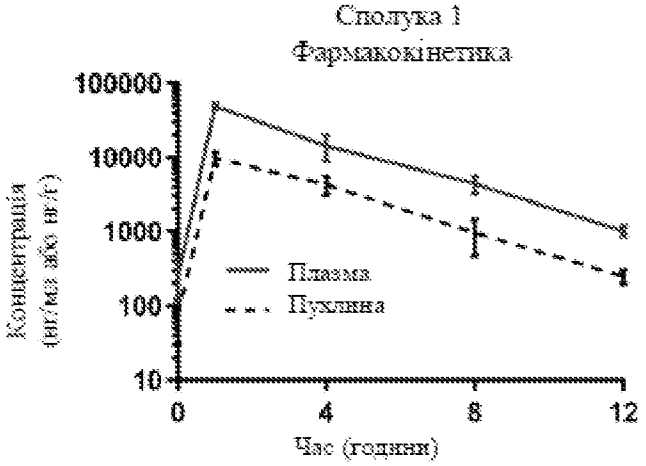
Фіг. 4B



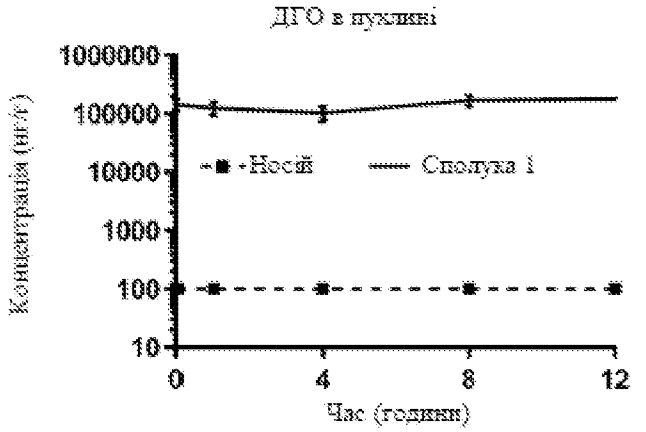
Фіг. 4C



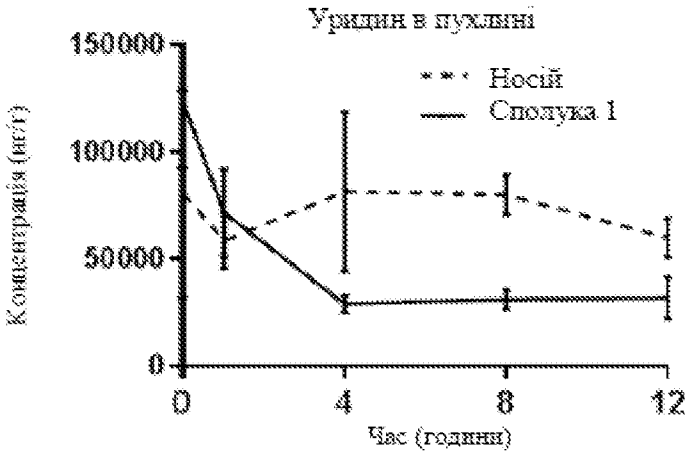
Фіг. 5A



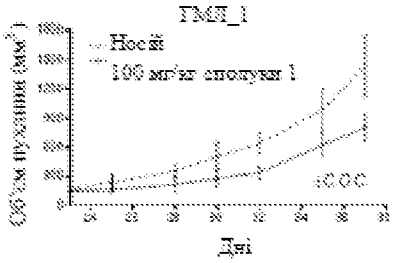
Фіг. 5B



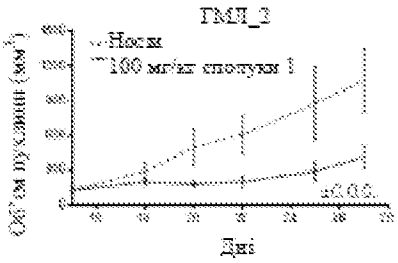
Фіг. 5C



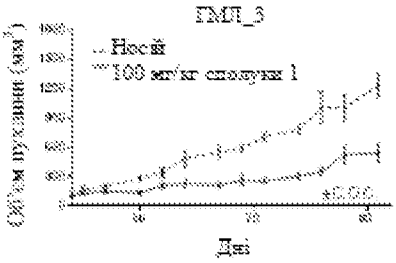
Фіг. 5D



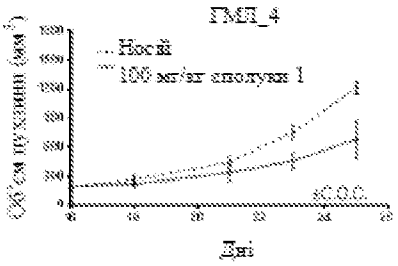
Фіг. 6A



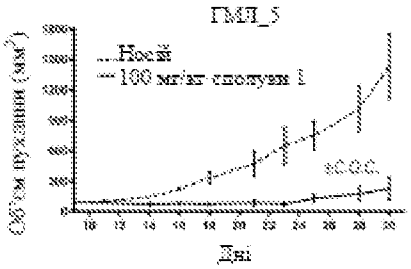
Фіг. 6B



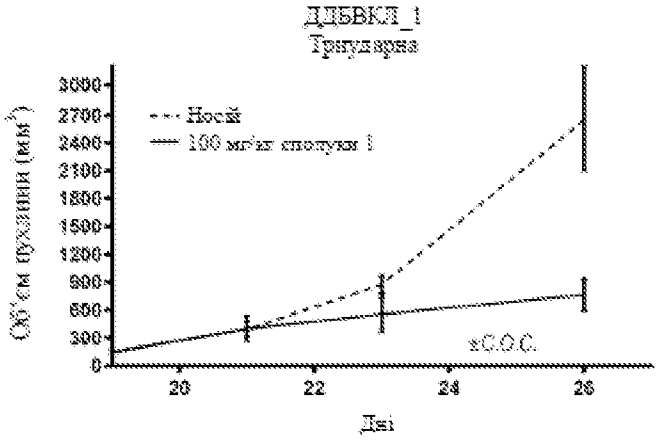
Фіг. 6C



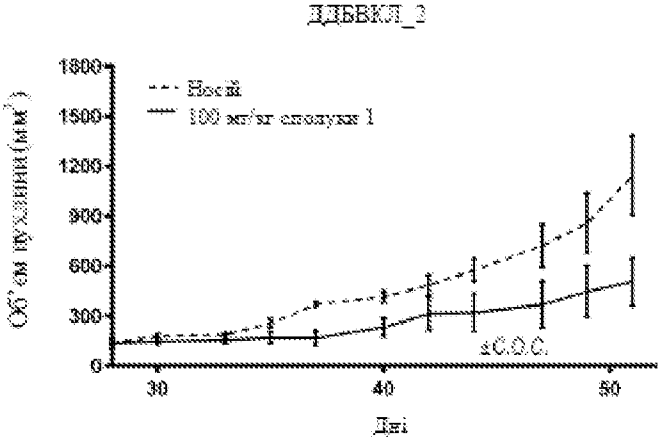
Фіг. 6D



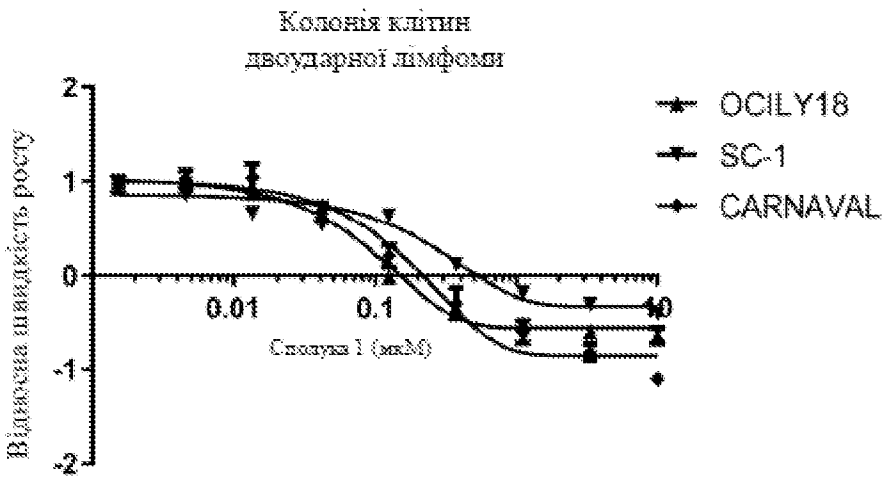
Фіг. 6E



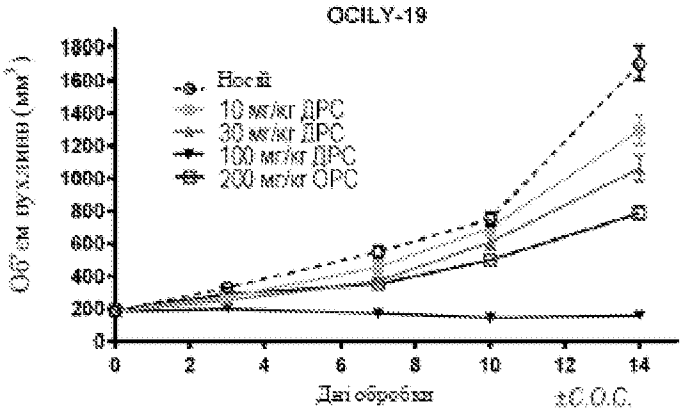
Фіг. 7A



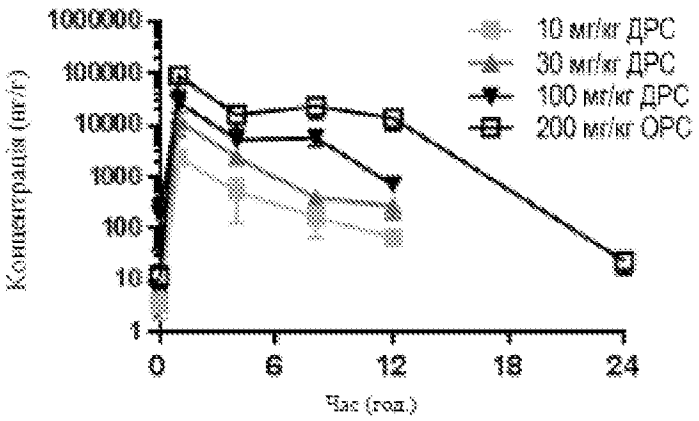
Фіг. 7B



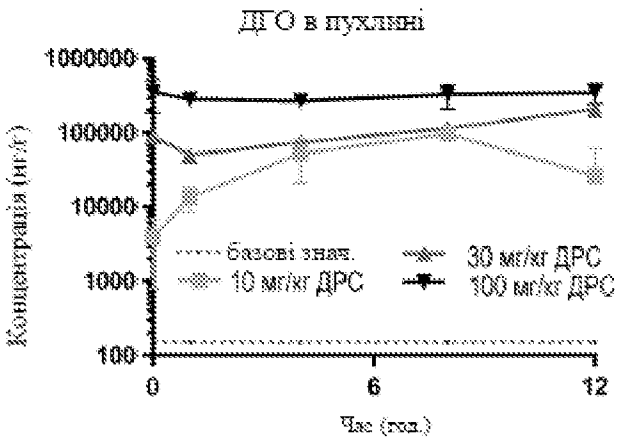
Фіг. 8



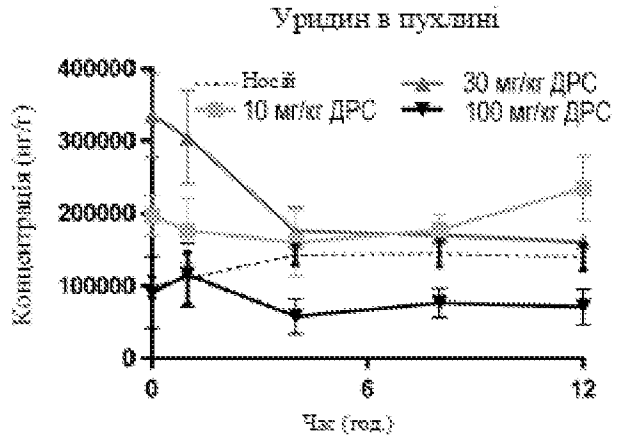
Фіг. 9А



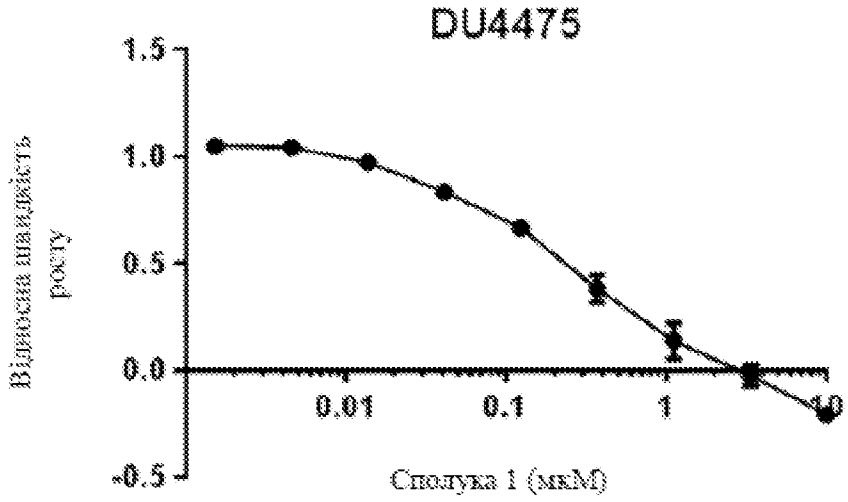
Фіг. 9В



Фіг. 9C



Фіг. 9D



Фіг. 10

Комп'ютерна верстка О. Рябко

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601