



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/497 (2020.05); A61K 45/00 (2020.05); A61P 35/00 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2017101189, 17.06.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.06.2015Дата регистрации:
12.11.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.05.2015 US 62/161,438;
31.10.2014 US 62/073,082;
29.08.2014 US 62/043,530;
17.06.2014 US 62/013,136

(43) Дата публикации заявки: 25.07.2018 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 12.11.2020 Бюл. № 32

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 17.01.2017(86) Заявка РСТ:
US 2015/036137 (17.06.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/195740 (23.12.2015)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

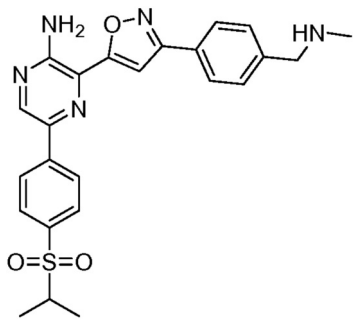
**ХЕЛЛЕДЕЙ Томас (SE),
САНДЖИВ Кумар (SE)**

(73) Патентообладатель(и):

**ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)**(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013/171470, 21.11.2013. WO 2013/
049720 A1, 04.04.2013. WO2013/049859,
04.04.2013. WO 2014/089379 A1, 12.06.2014.**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМБИНАЦИИ ИНГИБИТОРОВ SHK1
И ATR**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, а именно к лечению рака у пациента. Для этого вводят пациенту с раком эффективное количество соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу; и вводят пациенту эффективное количество соединения, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу; где соединение, которое ингибирует ATR, представляет собой



VE-822.

VE-822

или его фармацевтически приемлемую соль.

Группа изобретений также относится к способу стимуляции клеточной смерти раковых клеток у пациента, к применению соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу, при изготовлении лекарственного препарата для лечения рака у пациента и к применению соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу, при изготовлении лекарственного препарата для промотирования клеточной смерти раковых клеток у пациента. Группа изобретений обеспечивает синергический эффект при лечении рака, несмотря на целевые протеинкиназы, находящиеся на том же биологическом пути. 4 н. и 73 з.п. ф-лы, 10 ил., 14 пр.

RU 2736219 C2

RU 2736219 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/497 (2020.05); A61K 45/00 (2020.05); A61P 35/00 (2020.05)(21)(22) Application: **2017101189, 17.06.2015**(24) Effective date for property rights:
17.06.2015Registration date:
12.11.2020

Priority:

(30) Convention priority:
14.05.2015 US 62/161,438;
31.10.2014 US 62/073,082;
29.08.2014 US 62/043,530;
17.06.2014 US 62/013,136(43) Application published: **25.07.2018 Bull. № 21**(45) Date of publication: **12.11.2020 Bull. № 32**(85) Commencement of national phase: **17.01.2017**(86) PCT application:
US 2015/036137 (17.06.2015)(87) PCT publication:
WO 2015/195740 (23.12.2015)Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spaskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

HELLEDAY, Thomas (SE),
SANJIV, Kumar (SE)

(73) Proprietor(s):

VERTEX PHARMACEUTICALS
INCORPORATED (US)(54) **METHOD OF TREATING CANCER USING A COMBINATION OF CHK1 AND ATR INHIBITORS**

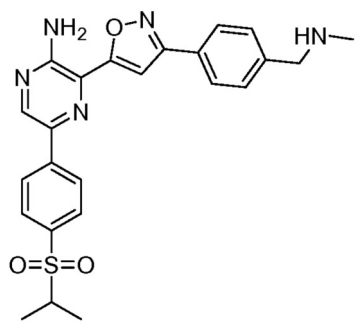
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to cancer treatment in a patient. That is ensured by administering an effective amount of a compound which inhibits ATR protein kinase to a patient suffering cancer; and administering to the patient an effective amount of a compound which inhibits Chk1 protein kinase; wherein the compound which inhibits ATR is

C 2
9 1 2 9 2 7 2
R U

R U
2 7 3 6 2 1 9
C 2



VE-822.

VE-822

or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Group of inventions also relates to a method of stimulating cell death of cancer cells in a patient, use of a compound which inhibits ATR protein kinase, when preparing a drug preparation for treating cancer in a patient and using the compound, which inhibits ATR protein kinase, in the manufacture of a medicament for promoting cancer cell death in a patient.

EFFECT: group of inventions provides a synergetic effect in treating cancer despite target protein kinases on the same biological pathway.

77 cl, 10 dwg, 14 ex

R U
2 7 3 6 2 1 9
2 7 3 6 2 1 9
C 2

R U
2 7 3 6 2 1 9
C 2

Предпосылки создания изобретения

[0001] ATR ("связанные ATM и Rad3") является ключевым медиатором клеточных ответов на повреждение структуры ДНК, которое характеризуется трактами одноцепочечной ДНК, покрытой белком репликации А (RPA). Покрытая RPA одноцепочечная ДНК обычно возникает в результате стресса репликации, что происходит, когда клетка пытается реплицировать ДНК через неразрешенные поражения повреждений ДНК. Ошибка восстановления репликации стресса может привести к летальным двухцепочечным разрывам или вредным мутациям ДНК. ATR вместе с его субстратами координирует несколько функций клеток в ответ на стресс репликации, включая контроль клеточного цикла, репликацию ДНК и репарацию повреждений ДНК. Chk1 представляет собой основу субстрата для ATR.

[0002] Раковые клетки, как правило, обладают высоким уровнем фона репликативного стресса, который может возникнуть из-за экспрессии онкогена, гипоксии или дефектов в других путях репарации, например, эксцизионной репарации. Это может привести к зависимости от ATR для выживания в некоторых раковых клетках. Кроме того, клетки требуют ATR для разрешения репликации стресса после лечения лекарственными средствами, множественно повреждающими ДНК, и ионизирующим излучением или после обработки агентами, которые блокируют другие пути восстановления, такими как PARP ингибиторы, которые блокируют эксцизионную репарацию оснований.

[0003] Ингибиторы пути передачи сигнала ATR были показаны для снижения клеточной выживаемости некоторых раковых клеток, которые экспрессируют онкогены, такие как циклин Е или Мус (см. Schoppa et. al., J Clin Invest, 2012, vol. 122, pp. 241-52); находящиеся в гипоксической среде (см. Pires et. al., Br J Cancer. 2012, vol. 107, pp. 291-99); или которые несут дефекты в других ДНК белков репарации, таких как ERCC1 (Mohni et. al., Cancer Res, 2014, vol. 74, pp. 2835-45). Кроме того, ингибиторы пути передачи сигнала ATR были показаны для сенсбилизации некоторых раковых клеток к цитотоксическим эффектам лекарственных средств множественного повреждения ДНК и ионизирующего излучения, или ингибиторов других путей репарации, например, PARP ингибиторов. В отличие от этого, нормальные клетки демонстрируют переносимость ингибирования ATR или отдельными средствами или при использовании в комбинации с другими средствами. Это объясняется активацией компенсационного восстановления передачи сигнала ДНК в нормальных клетках, которая часто недоступна для раковых клеток.

Сущность изобретения

[0004] Настоящее изобретение относится к способам лечения рака у пациента путем введения соединения, полезного в качестве ингибитора ATR протеинкиназы, в комбинации с соединением, полезным в качестве ингибитора Chk1 протеинкиназы. Приведенная выше комбинация проявляет удивительный синергический эффект при лечении рака, несмотря на протеинкиназы-мишени, находящиеся на том же самом биологическом пути. Кроме того, настоящее изобретение также относится к способам лечения рака путем введения соединения, полезного в качестве ингибитора ATR протеинкиназы; введения соединения, полезного в качестве ингибитора Chk1 протеинкиназы; а также введения одного или более повреждающих ДНК средств пациенту.

Краткое описание чертежей

На Фиг.1 представлен график, показывающий индуцирование пан-ядерного γ H2AX в клеточной линии U2OS, подвергнутых монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-

821.

На Фиг.2а представлен график, показывающий выживаемость по способности к колониеобразованию панели клеточных линий, подвергнутых монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-821.

5 На Фиг.2b представлен график, показывающий выживаемость по способности к колониеобразованию панели клеточных линий, подвергнутых лечению с VE-821.

На Фиг.2с представлен график оценки выживаемости по способности к колониеобразованию панели клеток, сверхэкспрессирующих сMyc онкоген, после проведения монотерапии и в комбинации с AZD7762 VE-821.

10 На Фиг.2d представлен график оценки выживаемости по способности к колониеобразованию панели клеток с инактивированным p53 и RB, и сверхэкспрессирующих H-RAS онкоген после проведения монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-821.

На Фиг.3а представлен график, показывающий объем опухоли у MX1 ксенотрансплантированных мышей, подвергнутых монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-822.

На Фиг.3b представлен график, показывающий кривую выживаемости для MX1 ксенотрансплантированных мышей, подвергнутых монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-822.

20 На Фиг.4а представллен график, показывающий объем опухоли у H460 ксенотрансплантированных мышей, подвергнутых монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-822.

На Фиг.4b представлен график, показывающий кривую выживаемости для H460 ксенотрансплантированных мышей, подвергнутых монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-822.

На Фиг.5 представлен график, показывающий уровни расщепляемой каспазы-3 в клетках U2OS, подвергнутых монотерапии и в комбинации с AZD7762 и VE-821.

На Фиг.6а представлен график, показывающий влияние ингибирования Chk1 и ингибирования ATR на уровни повреждения ДНК в раковых клетках U2OS путем измерения накопления пан-ядерного γ H2AX.

На Фиг.6b представлен график, показывающий влияние ингибирования Chk1 и ингибирования ATR на уровни повреждения ДНК в нормальных фибробластных клетках VH-10 путем измерения накопления пан-ядерного γ H2AX.

На Фиг.6с представлен график, показывающий влияние ингибирования Chk1 и ингибирования ATR на уровни повреждения ДНК в раковых клетках U2OS путем измерения накопления пан-ядерного γ H2AX.

На Фиг.6d представлен график, показывающий влияние ингибирования Chk1 и ингибирования ATR на уровни повреждения ДНК в раковых клетках U2OS при использовании анализа щелочной кометы.

40 На Фиг.7а представлен график, показывающий уровни ssДНК в раковых клетках U2OS после обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR, отдельно и в комбинации.

На Фиг.7b представлен график, показывающий уровни ssДНК в нормальных фибробластных клетках VH-10 после обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR, отдельно и в комбинации.

45 На Фиг.8а представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток U2OS после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

На Фиг.8b представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность

нормальных фибробластных клеток VH-10 после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

5 На Фиг.8с представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток H460 после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

На Фиг.8d представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток MX-1 после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

10 На Фиг.8e представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток HCT-116 после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

На Фиг.8f представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток MCF7 после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

15 На Фиг.8g представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность нормальных эндотелиальных клеток HUVEC после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

На Фиг.8h представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток HL60 после комбинированной обработки ингибитором Chk1 и ингибитором ATR.

20 На Фиг.9 представлен график, показывающий влияние ингибирования Chk1 и ингибирования ATR на уровни повреждения ДНК в нормальных фибробластных клетках VH-10 путем измерения накопления пан-ядерного γ H2AX и путем измерения накопления дискретных очагов γ H2AX и 53BP1.

25 На Фиг.10a представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток HT-29 после комбинированной обработки ингибитором ATR VE-822 и ингибитором Chk1 AZD-7762.

30 На Фиг.10b представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток HT-29 после комбинированной обработки ингибитором ATR VE-822 и ингибитором Chk1 LY-2603618.

На Фиг.10c представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток HT-29 после комбинированной обработки ингибитором ATR VE-822 и ингибитором Chk1 PF-477736.

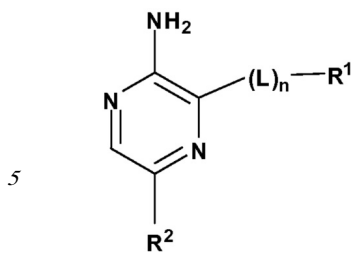
35 На Фиг.10d представлен график, показывающий клеточную жизнеспособность раковых клеток HT-29 после комбинированной обработки ингибитором ATR VE-822 и Chk1 ингибитором SCH-900776.

Подробное описание изобретения

40 [0005] Один или более аспектов настоящего изобретения предоставляют способ лечения рака у пациента, включающий введение первого соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназы; и введение второго соединения, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу. Другой аспект настоящего изобретения предоставляет способ лечения рака у пациента, включающий введение первого соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу; введение второго соединения, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу; и введение одного или более дополнительных терапевтических средств.

45 Соединения

[0006] В другом аспекте настоящего изобретения соединение, которое ингибирует ATR протеинкиназу, представлено формулой I:



или его фармацевтически приемлемая соль,

10 где

R^1 представляет собой 5-6-членный моноциклический арил или гетероарильное кольцо, имеющее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, где указанный моноциклический арил или гетероарильное кольцо необязательно конденсировано с другим кольцом, с образованием 8-10-членного бициклического арила или гетероарильного кольца, имеющего 0-6 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; каждый R^1 необязательно замещен 1-5 J^1 группами;

R^2 представляет собой 5-6-членный моноциклический арил или гетероарильное кольцо, имеющее 0-3 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, где указанный моноциклический арил или гетероарильное кольцо необязательно конденсировано с другим кольцом, с образованием 8-10-членного бициклического арила или гетероарильного кольца, имеющего 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; каждый R^2 необязательно замещен 1-5 J^2 группами;

L представляет собой -C(O)NH- или -C(O)N(C₁₋₆алкил)-;

25 n равен 0 или 1;

каждый J^1 и J^2 независимо представляет собой галоген, -CN, -NO₂, -V¹-R или -(V²)_m-Q;

V¹ представляет собой C₁₋₁₀алифатическую цепь, где 0-3 метиленовые единицы необязательно и независимо заменены O, NRⁿ, S, C(O), S(O) или S(O)₂; V¹ необязательно замещен 1-6 группами J^{V1};

V² представляет собой C₁₋₁₀алифатическую цепь, где 0-3 метиленовые единицы необязательно и независимо заменены O, NRⁿ, S, C(O), S(O) или S(O)₂; V² необязательно замещен 1-6 группами J^{V2};

m равен 0 или 1;

40 Q представляет собой 3-8-членное насыщенное или ненасыщенное моноциклическое кольцо, имеющее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или 9-10-членное насыщенное или ненасыщенное бициклическое кольцо, имеющее 0-6 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; каждый Q необязательно замещен 0-5 J^Q;

каждый J^{V1} или J^{V2} независимо представляет собой галоген, CN, NH₂, NO₂, C₁₋₄алифатическую группу, NH(C₁₋₄алифатическую группу), N(C₁₋₄алифатическую группу)₂, OH, O(C₁₋₄алифатическую группу), CO₂H, CO₂(C₁₋₄алифатическую группу), C(O)NH₂, C(O)NH(C₁₋₄алифатическую группу), C(O)N(C₁₋₄алифатическую группу)₂, NHCO(C₁₋₄алифатическую группу), N(C₁₋₄алифатическая группа)CO(C₁₋₄алифатическую

группу), $\text{SO}_2(\text{C}_{1-4}\text{алифатическую группу})$, $\text{NHSO}_2(\text{C}_{1-4}\text{алифатическую группу})$ или $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{алифатическая группа})\text{SO}_2(\text{C}_{1-4}\text{алифатическую группу})$, где указанная $\text{C}_{1-4}\text{алифатическая группа}$ необязательно замещена галогеном;

5 R представляет собой H или $\text{C}_{1-6}\text{алифатическую группу}$, где указанная $\text{C}_{1-6}\text{алифатическая группа}$ необязательно замещена 1-4 группами из NH_2 , $\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})_2$, галогена, $\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы}$, OH , $\text{O}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, NO_2 , CN , CO_2H ,
10 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{CO}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, O (галоген $\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы}$) или галоген $\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы}$;

каждый J^{Q} независимо представляет собой галоген, оксо, CN , NO_2 , X-R или $-(\text{X})_p\text{-Q}^4$;
р равен 0 или 1;

15 X представляет собой $\text{C}_{1-10}\text{алифатическую группу}$; где 1-3 метиленовых единиц указанной $\text{C}_{1-6}\text{алифатической группы}$ необязательно заменены $-\text{NR}$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $\text{C}(\text{O})$, $\text{S}(\text{O})_2$ или $\text{S}(\text{O})$; где X необязательно и независимо замещен 1-4 группами из NH_2 , $\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})_2$, галогена,
20 $\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы}$, OH , $\text{O}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, NO_2 , CN , $\text{CO}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, CO_2H , $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})_2$,
25 $\text{SO}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{SO}_2(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, $\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})_2$, $\text{NHC}(\text{O})$ ($\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы}$), $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{алифатическая группа})\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{алифатической группы})$, где указанная $\text{C}_{1-4}\text{алифатическая группа}$ необязательно замещена 1-3 группами галогена;

30 Q^4 представляет собой 3-8-членное насыщенное или ненасыщенное моноциклическое кольцо, имеющее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или 8-10-членное насыщенное или ненасыщенное бициклическое кольцо, имеющее 0-6 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; каждый Q^4 необязательно замещен 1-5 $\text{J}^{\text{Q}4}$;

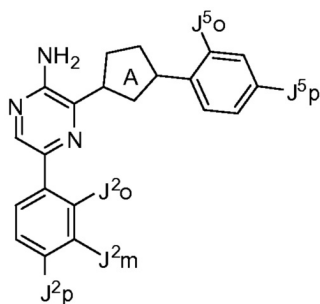
35 $\text{J}^{\text{Q}4}$ представляет собой галоген, CN или $\text{C}_{1-4}\text{алкил}$, где вплоть до 2 метиленовых единиц необязательно заменены O , NR^* , S , $\text{C}(\text{O})$, $\text{S}(\text{O})$ или $\text{S}(\text{O})_2$;

R представляет собой H или $\text{C}_{1-4}\text{алкил}$, где указанный $\text{C}_{1-4}\text{алкил}$ необязательно замещен 1-4 галогенами;

40 R' , R'' и R^* , каждый независимо, представляет собой H , $\text{C}_{1-4}\text{алкил}$ или отсутствует; где указанный $\text{C}_{1-4}\text{алкил}$ необязательно замещен 1-4 галогенами.

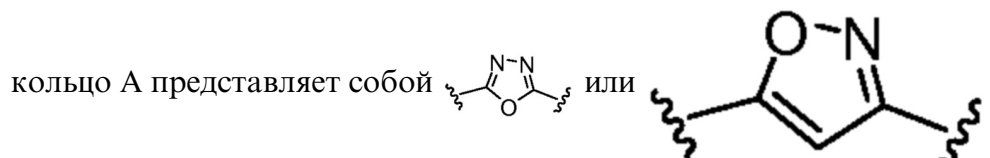
[0007] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$; и R^1 и R^2 представляют собой фенил.

45 [0008] В другом варианте осуществления соединение, которое ингибирует АТФ киназу, представлено формулой I-а:

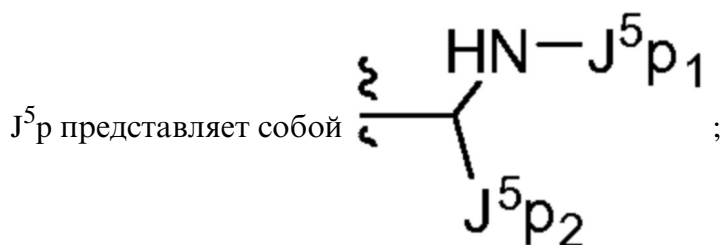


I-a

где



J^{5o} представляет собой H, F, Cl, C_{1-4} алифатическую группу, $O(C_{1-3}$ алифатическую группу) или OH;



J^{5p1} представляет собой H, C_{1-4} алифатическую группу, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил; где J^{5p1} необязательно замещен 1-2 группами OH или галогена;

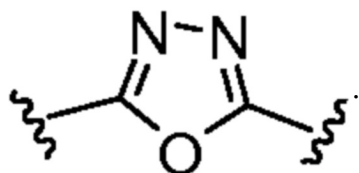
J^{5p2} представляет собой H, метил, этил, CH_2F , CF_3 или CH_2OH ;

J^{2o} представляет собой H, CN или SO_2CH_3 ;

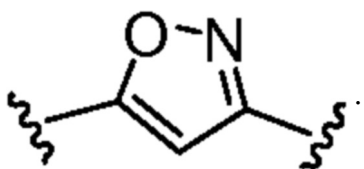
J^{2m} представляет собой H, F, Cl или метил;

J^{2p} представляет собой $-SO_2(C_{1-6}$ алкил), $-SO_2(C_{3-6}$ циклоалкил), $-SO_2(4-6-членный$ гетероцикл), $-SO_2(C_{1-4}$ алкил) $N(C_{1-4}$ алкил) $_2$ или $-SO_2(C_{1-4}$ алкил)-(4-6-членный гетероцикл), где указанный гетероцикл содержит 1 гетероатом, выбранный из кислорода, азота или серы; и где указанный J^{2p} необязательно замещен 1-3 группами галогена, OH или $O(C_{1-4}$ алкила).

[0009] В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой

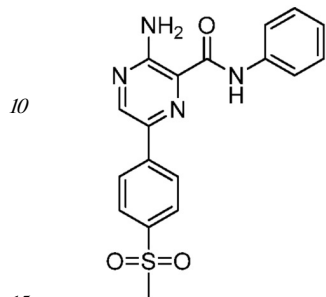


[0010] В других вариантах осуществления кольцо А представляет собой



5

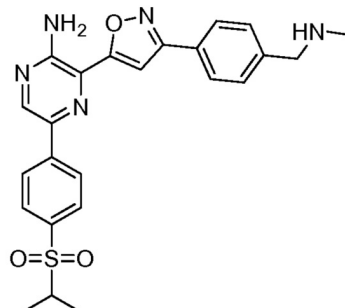
[0011] В некоторых вариантах осуществления соединение, которое ингибирует АТР киназу, выбрано из:



10

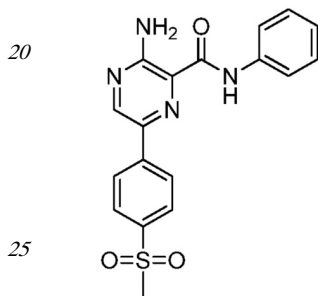
15

VE-821



VE-822.

[0012] В некоторых вариантах осуществления соединение, которое ингибирует АТР киназу, представляет собой:

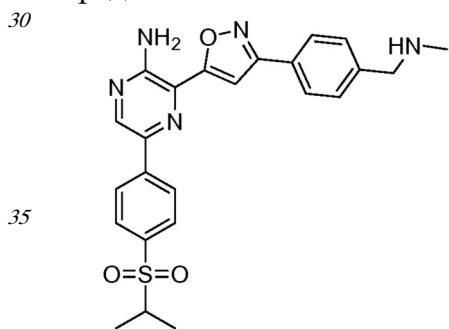


20

25

VE-821.

[0013] В другом варианте осуществления соединение, которое ингибирует АТР киназу, представляет собой:



30

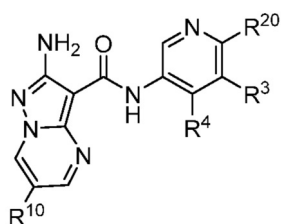
35

VE-822.

[0014] В другом аспекте настоящего изобретения соединение, которое ингибирует АТР протеинкиназу, представлено формулой II:

40

45



II

или его фармацевтической солью или производным, где:

R^{10} независимо выбран из фтора, хлора или $-C(J^{10})_2CN$;

J^{10} независимо выбран из H или C_{1-2} алкила; или

5 две группы J^{10} , вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-4-членное, необязательно замещенное карбоциклическое кольцо;

R^{20} независимо выбран из H; галогена; $-CN$; NH_2 ; C_{1-2} алкила, необязательно замещенного 0-3 группами фтора; или C_{1-3} алифатической цепи, где вплоть до двух
10 метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$;

R^3 независимо выбран из H; галогена; C_{1-4} алкила, необязательно замещенного 1-3 группами галогена; C_{3-4} циклоалкила; $-CN$; или C_{1-3} алифатической цепи, где вплоть до
15 двух метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$;

R^4 независимо выбран из Q^1 или C_{1-10} алифатической цепи, где вплоть до четырех
20 метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$; каждый R^4 необязательно замещен 0-5 группами J^{Q1} ; или

R^3 и R^4 , вместе с атомами, с которыми они связаны, образуют 5-6-членное ароматическое или неароматическое кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из
25 кислорода, азота или серы; причем кольцо, образованное R^3 и R^4 , необязательно замещено 0-3 группами J^Z ;

Q^1 независимо выбран из 3-7-членного, полностью насыщенного, частично ненасыщенного или ароматического моноциклического кольца, 3-7-членного кольца,
30 имеющего 0-3 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или 7-12-членного полностью насыщенного, частично ненасыщенного или ароматического бициклического кольца, имеющего 0-5 гетероатомов, выбранных из кислорода, азота или серы;

J^Z независимо выбран из C_{1-6} алифатической группы, $=O$, галогена или $\rightarrow O$;

J^{Q1} независимо выбран из $-CN$; галогена; $=O$; Q^2 ; или C_{1-8} алифатической цепи, где
35 вплоть до трех метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$; каждая из присутствующих групп J^{Q1} необязательно замещена 0-3 группами J^R ; или

40 две группы J^{Q1} на одном и том же атоме, взятые вместе с атомом, с которым они соединены, образуют 3-6-членное кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; где кольцо, образованное двумя группами J^{Q1} , необязательно замещено 0-3 группами J^X ; или

45 две группы J^{Q1} , вместе с Q^1 , образуют 6-10-членную, насыщенную или частично ненасыщенную мостиковую кольцевую систему;

Q^2 независимо выбран из 3-7-членного, полностью насыщенного, частично ненасыщенного или ароматического моноциклического кольца, имеющего 0-3

гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или 7-12-членного полностью насыщенного, частично ненасыщенного или ароматического бициклического кольца, имеющего 0-5 гетероатомов, выбранных из кислорода, азота или серы;

J^R независимо выбран из -CN; галогена; =O; →O; Q^3 ; или C_{1-6} алифатической цепи, где вплоть до трех метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены -O-, $-NR^a$ -, -C(O)- или $-S(O)_z$ -; каждый J^R необязательно замещен 0-3 группами J^T ; или

две группы J^R на одном и том же атоме, вместе с атомом, с которым они соединены, образуют 3-6-членное кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; где кольцо, образованное двумя группами J^R , необязательно замещено 0-3 группами J^X ; или

две группы J^R , вместе с Q^2 образуют 6-10-членную, насыщенную или частично ненасыщенную мостиковую кольцевую систему;

Q^3 представляет собой 3-7-членное, полностью насыщенное, частично ненасыщенное или ароматическое моноциклическое кольцо, имеющее 0-3 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или 7-12-членное полностью насыщенное, частично ненасыщенное или ароматическое бициклическое кольцо, имеющее 0-5 гетероатомов, выбранных из кислорода, азота или серы;

J^X независимо выбран из -CN; =O; галогена; или C_{1-4} алифатической цепи, где вплоть до двух метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены -O-, $-NR^a$ -, -C(O)- или $-S(O)_z$ -;

J^T независимо выбран из галогена, -CN; →O; =O; -OH; C_{1-6} алифатической цепи, где вплоть до двух метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены -O-, $-NR^a$ -, -C(O)- или $-S(O)_z$ -; или 3-6-членного неароматического кольца, имеющего 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; каждая из присутствующих групп J^T необязательно замещена 0-3 группами J^M ; или

две группы J^T на одном и том же атоме, вместе с атомом, с которым они соединены, образуют 3-6-членное кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или

две группы J^T , вместе с Q^3 образуют 6-10-членную, насыщенную или частично ненасыщенную мостиковую кольцевую систему;

J^M независимо выбран из галогена или C_{1-6} алифатической группы;

J представляет собой H или Cl;

z равен 0, 1 или 2; и

R^a независимо выбран из H или C_{1-4} алифатической группы.

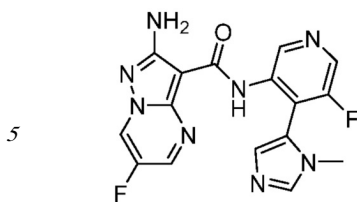
[0015] В некоторых вариантах осуществления R^{10} и R^3 представляют собой фтор.

[0016] В других вариантах осуществления R^4 представляет собой Q^1 .

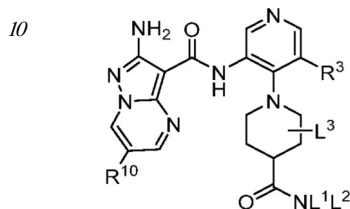
[0017] Еще в других вариантах осуществления Q^1 независимо выбран из пиперидинила и имидазолила.

[0018] Еще в другом варианте осуществления соединение, которое ингибирует ATR,

представлено структурой:



[0019] В другом варианте осуществления соединения, которое ингибирует ATR, представлено формулой II-a:



II-a

или его фармацевтически приемлемой солью или пролекарством, где:

R^{10} независимо выбран из фтора, хлора или $-C(J^{10})_2CN$;

J^{10} независимо выбран из H или C_{1-2} алкила; или

две группы J^1 , вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное 3-4-членное карбоциклическое кольцо;

R^3 независимо выбран из H; хлора; фтора; C_{1-4} алкила, необязательно замещенного 1-3 группами галогена; C_{3-4} циклоалкила; $-CN$; или C_{1-3} алифатической цепи, где вплоть до двух метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$;

L^1 представляет собой H; 3-7-членное ароматическое или неароматическое кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или C_{1-6} алифатическую цепь, где вплоть до двух метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$; каждый L^1 необязательно замещен C_{1-4} алифатической группой; $-CN$; галогеном; $-OH$; или 3-6-членным неароматическим кольцом, имеющим 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы;

L^2 представляет собой H; 3-7-членное ароматическое или неароматическое кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или C_{1-6} алифатическую цепь, где вплоть до двух метиленовых единиц данной алифатической цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$; каждый L^2 необязательно замещен C_{1-4} алифатической группой; $-CN$; галогеном; $-OH$; или 3-6-членным неароматическим кольцом, имеющим 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или

L^1 и L^2 , вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют кольцо D; причем кольцо D необязательно замещено 0-5 группами J^G ;

L^3 представляет собой H; C_{1-3} алифатическую группу или CN;

кольцо D независимо выбрано из 3-7-членного гетероциклического кольца, имеющего 1-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или 7-12-членного полностью насыщенного или частично ненасыщенного бициклического кольца, имеющего 1-5 гетероатомов, выбранных из кислорода, азота или серы;

5 J^G независимо выбран из галогена; $-CN$; $-N(R^\circ)_2$; $\rightarrow O$; 3-6-членного карбоциклила; 3-6-членного гетероциклила, имеющего 1-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или C_{1-4} алкильной цепи, где вплоть до двух метиленовых единиц данной алкильной цепи необязательно заменены $-O-$, $-NR^a-$, $-C(O)-$ или $-S(O)_z$; каждый J^G
10 необязательно замещен 0-2 группами J^K ;

две группы J^G на одном и том же атоме, вместе с атомом, с которым они соединены, образуют 3-6-членное кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы; или

15 две группы J^G , вместе с кольцом D, образуют 6-10-членную, насыщенную или частично ненасыщенную мостиковую кольцевую систему;

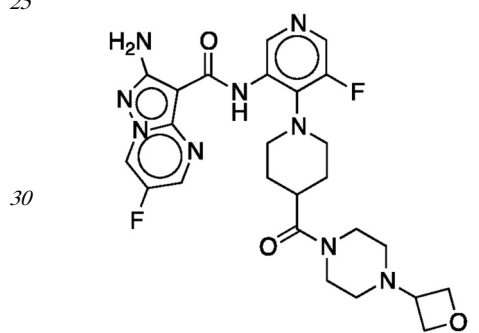
J^K представляет собой 3-7-членное ароматическое или неароматическое кольцо, имеющее 0-2 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы;

20 z равен 0, 1 или 2; и

R^a и R° представляют собой H или C_{1-4} алкил.

[0020] В другом варианте осуществления R^1 и R^3 представляют собой фтор.

25 [0021] Еще в других вариантах осуществления соединение, которое ингибирует ATR, представлено структурой:



35 [0022] Еще в другом варианте осуществления соединение выбрано из соединений, описанных в WO 2010/071837 или WO 2014/089379.

[0023] В другом варианте осуществления соединение, которое ингибирует Chk1 киназу, независимо выбрано из AZD7762, LY2603618, MK-8776, SHIR-124 и PF-477736. Способ получения ингибиторов Chk1 известен специалисту в данной области техники.

40 [0024] В некоторых вариантах осуществления переменные, как показано в соединениях настоящего изобретения, включают соединения, приведенные в таблицах настоящего описания.

[0025] Для целей настоящего изобретения будет понято, что термины, используемые в вариантах осуществления, примерах и аспектах, применяются взаимозаменяемо.

45 [0026] Для целей настоящего изобретения, следует понимать, что когда две группы J^{Q1} , вместе с Q^1 образуют мостиковую кольцевую систему, две группы J^{Q1} присоединены к отдельным атомам Q^1 . Кроме того, когда две группы J^R , вместе с Q^2 образуют мостиковую кольцевую систему, две группы J^R присоединены к отдельным атомам

Q^2 . Более того, когда две группы J^T , вместе с Q^3 образуют мостиковую кольцевую систему, две группы J^T присоединены к отдельным атомам Q^3 . Наконец, когда две группы J^G , вместе с кольцом D образуют мостиковую кольцевую систему, две группы J^G присоединены к отдельным атомам кольца D.

[0027] Для целей настоящего изобретения, следует понимать, что термины ATR, ATR киназа и ATR протеинкиназа используются взаимозаменяемо. Аналогичным образом, термины Chk1, Chk1 киназа и Chk1 протеинкиназа используются взаимозаменяемо.

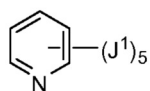
[0028] Специалисту в данной области техники будет понятно, что стрелка в $\rightarrow O$ указывает на семиполярную связь.

[0029] Соединения настоящего изобретения включают соединения, в основном описаны в данном описании и дополнительно проиллюстрированы описанными в данном описании классами, подклассами и видами. Как используется в данном описании, применяются следующие определения, если не указано иное. Для целей настоящего изобретения, химические элементы определяются в соответствии с периодической таблицей элементов, CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, все содержание которых включено в данное описание посредством ссылки.

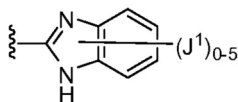
[0030] Как описано в данном описании, указанный диапазон номеров атомов включает любое целое число. Например, группа, имеющая 1-4 атома, может иметь 1, 2, 3 или 4 атома.

[0031] Как описано в данном описании, соединения по изобретению могут быть необязательно замещены одним или более заместителями, такими как в основном проиллюстрировано в данном описании или на примере отдельных классов, подклассов и видов по настоящему изобретению. Следует учитывать, что фраза «необязательно замещенный» используется взаимозаменяемо с фразой «замещенный или незамещенный». Как правило, термин «замещенный», предшествует ли ему термин «необязательно» или нет, относится к замене водородных радикалов в заданной структуре радикалом указанного заместителя. Если не указано иное, необязательно замещенная группа может иметь заместитель в каждом замещаемом положении данной группы, и когда более чем одно положение в любой заданной структуре может быть замещено более чем одним заместителем, выбранным из конкретной группы, причем данные заместители могут быть одинаковыми или различными в каждом из положений. Комбинации заместителей, предусмотренных настоящим изобретением, предпочтительно являются такими, которые приводят к образованию стабильных или химически возможных соединений.

[0032] Если специально не указано иное, заместитель, соединенный связью, проведенной от центра кольца, указывает на то, что заместитель может быть связан в любом положении кольца. В примере i ниже, например, J^1 может быть связан в любом положении пиридинского кольца. Для бициклических колец связь, проведенная через оба кольца, указывает на то, что заместитель может быть связан в любом положении бициклического кольца. В примере ii ниже, например, J^1 может быть связан с 5-членным кольцом (на атоме азота, например) и с 6-членным кольцом.



i



ii

5 [0033] Термин "стабильный", как используется в данном описании, относится к соединениям, которые не изменяют своей стабильности в заявляемых условиях для их производства, обнаружения, восстановления, очистки и применения для одной или более целей, описанных в данном описании. В некоторых вариантах осуществления стабильное соединение или химически возможное соединение является таким, которое
10 по существу не изменяется при хранении при температуре 40°C или менее, в отсутствие влаги или в других химически активных условиях по меньшей мере в течение недели.

[0034] Термин "семиполярная связь", как используется в данном описании, определяется как координационная связь, образующаяся при взаимодействии между типами молекул, одна из которых выступает в качестве донора, а другая в качестве
15 акцептора для разделения электронной пары в формируемом комплексе.

[0035] Термин "алифатическая группа" или "алифатический", как используется в данном описании, означает прямую цепь (т.е. неразветвленную), разветвленную или циклическую, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая является полностью насыщенной или которая содержит одну или более единиц ненасыщенности,
20 и которая имеет одну точку присоединения к остальной части данной молекулы.

[0036] Если специально не указано иное, алифатические группы содержат 1-20 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-10 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-8 алифатических атомов углерода.
25 Еще в других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-6 алифатических атомов углерода, и еще в других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-4 алифатических атома углерода. Алифатические группы могут быть линейными или разветвленными, замещенными или незамещенными алкильными, алкенильными или алкинильными группами. Конкретные примеры включают, но, не
30 ограничиваясь ими, метил, этил, изопропил, н-пропил, втор-бутил, винил, н-бутенил, этинил и трет-бутил. Алифатические группы также могут быть циклическими или иметь комбинацию линейных или разветвленных и циклических групп. Примеры таких типов алифатических групп включают, но, не ограничиваясь ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогексенил, -CH₂-циклопропил, CH₂CH₂CH(CH₃)-
35 циклогексил.

[0037] Термин "циклоалифатический" (или "карбоцикл" или "карбоциклил") относится к моноциклическому C₃-C₈ углеводороду или бициклическому C₈-C₁₂ углеводороду, который является полностью насыщенным или который содержит одну или более единиц ненасыщенности, но который не является ароматическим, который имеет одну
40 точку присоединения к остальной части молекулы, где любое индивидуальное кольцо в указанной бициклической кольцевой системе имеет 3-7 членов. Примеры циклоалифатических групп включают, но, не ограничиваясь ими, циклоалкильные и циклоалкенильные группы. Конкретные примеры включают, но, не ограничиваясь ими, циклогексил, циклопропил и циклобутил.

[0038] Термин "гетероцикл", "гетероциклил" или "гетероциклический", как используется в данном описании, означает неароматические, моноциклические, бициклические или трициклические кольцевые системы, в которых один или более членов кольца представляют собой независимо выбранный гетероатом. В некоторых вариантах

осуществления "гетероцикл", "гетероциклил" или "гетероциклическая" группа имеет три-четыренадцать членов кольца, в котором один или более членов кольца представляет собой гетероатом, независимо выбранный из кислорода, серы, азота или фосфора, и каждое кольцо в данной системе содержит 3-7 членов кольца.

5 [0039] Примеры гетероциклов включают, но, не ограничиваясь ими, 3-1H-бензимидазол-2-он, 3-(1-алкил)бензимидазол-2-он, 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-тетрагидротиофенил, 3-тетрагидротиофенил, 2-морфолино, 3-морфолино, 4-морфолино, 2-тиоморфолино, 3-тиоморфолино, 4-тиоморфолино, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил, 3-пирролидинил, 1-тетрагидропиперазинил, 2-тетрагидропиперазинил, 3-тетрагидропиперазинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 1-пиразолинил, 3-пиразолинил, 4-пиразолинил, 5-пиразолинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-пиперидинил, 2-тиазолидинил, 3-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 1-имидазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил, 5-имидазолидинил, индолинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, бензотиолан, бензодитиан и 1,3-дигидроимидазол-2-он.

[0040] Циклические группы, (например, циклоалифатические и гетероциклические) могут быть линейно конденсированными, мостиковыми или спироциклическими.

[0041] Термин "гетероатом" означает один или более из кислорода, серы, азота, фосфора или кремния (включая, любую окисленную форму азота, серы, фосфора или кремния; кватернизованную форму любого основного азота; или замещаемого азота гетероциклического кольца, например, N (как в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или NR⁺ (как в N-замещенном пирролидиниле)).

[0042] Термин "ненасыщенный", как используется в данном описании, означает, что фрагмент имеет одну или более единиц ненасыщенности. Как известно специалисту в данной области техники, ненасыщенные группы могут быть частично ненасыщенными или полностью ненасыщенными. Примеры частично ненасыщенных групп включают, но, не ограничиваясь ими, бутен, циклогексен и тетрагидропиридин. Полностью ненасыщенные группы могут быть ароматическими, антиароматическими или неароматическими. Примеры полностью ненасыщенных групп включают, но, не ограничиваясь ими, фенил, циклооктатриен, пиридил, тиенил и 1-метилпиридин-2(1H)-он.

[0043] Термин "алкокси" или "тиоалкил", как используется в данном описании, относится к алкильной группе, как определено выше, присоединенный через атом кислорода ("алкокси") или серы ("тиоалкил").

35 [0044] Термины "галогеналкил", "галогеналкенил", "галогеналифатические" и "галогеналкокси" означают алкил, алкенил или алкокси, в данном случае, замещенные одним или более атомами галогена. Этот термин включает перфторированные алкильные группы, такие как -CF₃ и -CF₂CF₃.

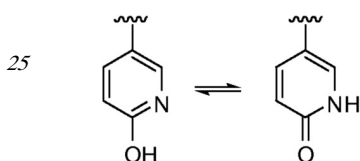
40 [0045] Термины "галоген", "гало" и "галоид" означают F, Cl, Br или I.

[0046] Термин "арил", используемый отдельно или как часть большого фрагмента, как в "аралкиле", "аралкокси" или "арилоксиалкиле", относится к моноциклической, бициклической и трициклической кольцевой системе, имеющей в общем пять-четыренадцать членов кольца, где по меньшей мере одно кольцо в данной системе является ароматическим, и где каждое кольцо в данной системе содержит 3-7 членов кольца. Термин "арил" может использоваться взаимозаменяемо с термином "арильное кольцо".

[0047] Термин "гетероарил", используемый отдельно или как часть большого фрагмента, как в "гетероаралкиле" или "гетероарилалкокси", относится к

моноциклической, бициклической и трициклической кольцевой системе, имеющей в общем пять-четырнадцать членов кольца, где по меньшей мере одно кольцо в данной системе является ароматическим, по меньшей мере одно кольцо в данной системе содержит один или более гетероатомов, и где каждое кольцо в данной системе содержит 3-7 членов кольца. Термин "гетероарил" может использоваться взаимозаменяемо с термином "гетероарильное кольцо" или термином "гетероароматический". Примеры гетероарильных колец включают, но, не ограничиваясь ими, 2-фуранил, 3-фуранил, N-имидазолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, 5-имидазолил, бензимидазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил, N-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, пиридазинил (например, 3-пиридазинил), 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, тетразолил (например, 5-тетразолил), триазолил (например, 2-триазолил и 5-триазолил), 2-тиенил, 3-тиенил, бензофурил, бензотиофенил, индолил (например, 2-индолил), пиразолил (например, 2-пиразолил), изотиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, пуринил, пиразинил, 1,3,5-триазинил, хинолинил (например, 2-хинолинил, 3-хинолинил, 4-хинолинил) и изохинолинил (например, 1-изохинолинил, 3-изохинолинил или 4-изохинолинил).

[0048] Следует понимать, что термин "гетероарил" включает определенные типы гетероарильных колец, которые существуют в равновесии между двумя различными формами. Более конкретно, например, типы, такие как гидропиридин и пиридинон (а также гидроксипиримидин и пиримидинон) предназначены, чтобы охватываться определением "гетероарил".



[0049] Термины "защитная группа" и "защищающая группа", как используется в данном описании, являются взаимозаменяемыми и относятся к агентам временного блокирования одной или нескольких желаемых функциональных групп в соединении с несколькими реакционноспособными сайтами. В определенных вариантах осуществления одна или несколько защитных групп или предпочтительно все обладают следующими характеристиками: а) при выборочном добавлении к функциональным группам дают защищенный субстрат с хорошим выходом, которые являются б) стабильными при реакциях, происходящих в одном или нескольких других реакционноспособных сайтах; и с) селективно удаляемыми с хорошим выходом при помощи реагентов, которые не воздействуют на восстановленные, подвергнутые удалению защиты функциональные группы. Как будет понятно специалисту в данной области, в некоторых случаях, данные реагенты не влияют на другие реакционноспособные группы в данном соединении. В других случаях, указанные реагенты могут также взаимодействовать с другими реакционноспособными группами в данном соединении. Примеры защитных групп подробно описаны в Greene, T.W., Wuts, P. G in "Protective groups in Organic Synthesis", Third Edition, John Wiley & Sons, New York: 1999 (и в других изданиях данного пособия), полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки. Термин "защитная группа азота", как используется в данном описании, относится к агенту, используемому для временного блокирования одного или более желаемых азотных реакционноспособных сайтов в соединении с множественными функциональными группами. Предпочтительные

защитные группы азота также обладают характеристиками, приведенными для иллюстративных защитных групп выше, и определенные примеры защитных групп азота также подробно описаны в Chapter 7 Greene, T.W., Wuts, P. G in "Protective groups in Organic Synthesis", Third Edition, John Wiley & Sons, New York: 1999, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки.

[0050] В некоторых вариантах осуществления метиленовая единица алкильной или алифатической цепи необязательно заменена другим атомом или группой. Примеры таких атомов или групп включают, но, не ограничиваясь ими, азот, кислород, серу, -C(O)-, -C(=N-CN)-, -C(=NR)-, -C(=NOR)-, -SO- и -SO₂-. Такие атомы или группы могут комбинироваться, с образованием более крупных групп. Примеры таких крупных групп включают, но, не ограничиваясь ими, -OC(O)-, -C(O)CO-, -CO₂-, -C(O)NR-, -C(=N-CN), -NRCO-, -NRC(O)O-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -NRC(O)NR-, -OC(O)NR- и -NRSO₂NR-, где R представляет собой, например, H или C₁₋₆алифатическую группу. Следует понимать, что такие группы могут быть связаны с метиленовыми единицами данной алифатической цепи через простую, двойную или тройную связи. Примером необязательной замены (в данном случае, у атома азота), который связан с алифатической цепью через двойную связь, будет -CH₂CH=N-CH₃. В некоторых случаях, особенно на концевом участке, необязательная замена может быть связана с алифатической группой через тройную связь. Одним из таких примеров будет CH₂CH₂CH₂C≡N. Следует понимать, что в подобных ситуациях, конечный азот не будет связан с другим атомом.

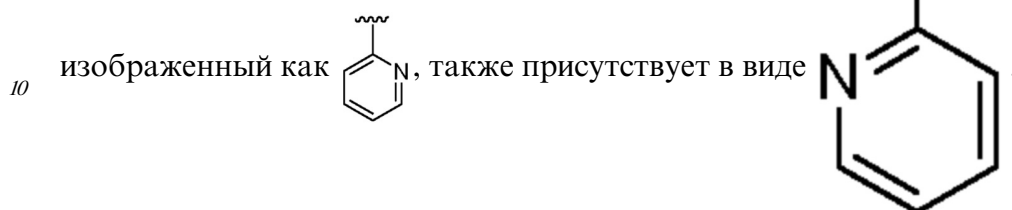
[0051] Также следует понимать, что термин "метиленовая единица" может относиться к разветвленным или замещенным метиленовым единицам. Например, в изопропильном фрагменте [-CH(CH₃)₂], при замене атомом азота (например, NR) первой повторяемой "метиленовой единицы", результатом будет диметиламин [-N(CH₃)₂]. В таких случаях, как указано выше, специалисту в данной области будет понятно, что данный атом азота не будет иметь дополнительного, связанного с ним атома, и "R" из "NR", в этом случае, будет отсутствовать.

[0052] Если специально не указано иное, необязательные замены образуют химически стабильное соединение. Необязательные замены могут существовать как в цепи, так и/или на любом конце цепи; т.е. как в точке присоединения, так и/или также на конце цепи. Две необязательные замены также могут быть рядом друг с другом в цепи до тех пор, пока это приводит к химически стабильному соединению. Например, C₃ алифатическая группа может быть необязательно заменена 2 атомами азота, с образованием -C-N≡N. Необязательные замены могут полностью заменять все атомы углерода в цепи. Например, C₃ алифатическая группа может быть необязательно заменена -NR-, -C(O)- и -NR-, с образованием -NRC(O)NR- (мочевина).

[0053] Если специально не указано иное, когда замена существует в концевой области, заменяющий атом связан с атомом водорода конца цепи. Например, если метиленовая единица группы -CH₂CH₂CH₃ необязательно заменена -O-, образовавшееся в результате соединение может представлять собой -OCH₂CH₃, -CH₂OCH₃ или -CH₂CH₂OH. Следует понимать, что если конечный атом не содержит любой свободной электронной валентности, тогда атом водорода не предусматривается на конце цепи (например, -CH₂CH₂CH=O или -CH₂CH₂C≡N).

[0054] Если специально не указано иное, структуры, приведенные в данном описании, также предназначены для включения всех изомерных форм (например, энантиомерной,

диастереомерной, геометрической, конформационной и ротационной) данной структуры. Например, R и S конфигурации для каждого асимметрического центра, (Z) и (E) изомеры с двойными связями, и (Z) и (E) конформационные изомеры включены в настоящее изобретение. Как будет понятно специалисту в данной области, заместитель может свободно вращаться вокруг любых вращающихся связей. Например, заместитель,



[0055] Поэтому, индивидуальные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные, геометрические, конформационные и ротационные смеси настоящих соединений входят в объем настоящего изобретения.

[0056] Если специально не указано иное, все таутомерные формы соединений по изобретению входят в объем настоящего изобретения.

[0057] Кроме того, если специально не указано иное, структуры, представленные в данном описании, включают соединения, которые отличаются только присутствием одного или нескольких обогащенных изотопом атомов. Например, соединения, имеющие представленные структуры, за исключением того, что атом водорода заменен дейтерием или тритием, атом углерода заменен ^{13}C - или ^{14}C -обогащенным углеродом, входят в объем настоящего изобретения. Такие соединения полезны, например, в качестве аналитических инструментов или проб в биологических анализах.

Фармацевтически приемлемые соли, сольваты, клатраты, пролекарства и другие производные

[0058] Соединения, описываемые в данном описании, могут существовать в свободной форме или, если необходимо, в форме солей. Такие соли, которые являются фармацевтически приемлемыми, представляют практический интерес в тех случаях, пока они являются полезными при введении соединений, описанных ниже. Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, полезны в способах производства для целей выделения и очистки, и в некоторых случаях, для применения при разделении стереоизомерных форм соединений по изобретению или их полупродуктов.

[0059] Как используется в данном описании, термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям соединения, которые с медицинской точки зрения подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без побочных эффектов, таких как токсичность, раздражение, аллергические реакции и прочее, и соизмеримы с соотношением разумная выгода/риск.

[0060] Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, у S.M. Berge с соавторами подробно описаны фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19, включенном в данное описание посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений, описываемых в данном описании, включают такие, которые получены из подходящих неорганических или органических кислот и оснований. Такие соли могут быть получены *in situ* в ходе конечного выделения или очистки данных соединений.

[0061] Когда соединение, описываемое в данном описании, содержит основную группу или соответствующий основной биоизомер, кислотно-аддитивные соли могут

быть получены путем 1) взаимодействия очищенного соединения в его свободно-основной форме с подходящей органической или неорганической кислотой, и 2) выделения образовавшейся в результате этого соли. На практике, кислотно-аддитивные соли являются более удобной формой для применения, и использование данной соли

5 равнозначно использованию свободной основной формы.

[0062] Примерами фармацевтически приемлемых, нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминокислот, образованных с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная

10 кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или при использовании других методов, применяемых в данной области техники, таких как ионообмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают такие соли, как адипинат, альгинат, аскорбат, аспарат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат,

15 цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гликолят, глюконат, гликолят, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, пальмоат,

20 пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, салицилат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и тому подобное.

[0063] Когда соединение, описываемое в данном описании, содержит карбоксигруппу или по существу кислотный биоизомер, аддитивные соли оснований могут быть

25 получены путем 1) взаимодействия очищенного соединения в его кислотной форме с подходящим органическим или неорганическим основанием, и 2) выделения образовавшейся в результате этого соли. На практике, аддитивные соли основания являются более удобной формой для применения, и использование данной соли равнозначно использованию свободной кислотной формы. Соли, полученные из

30 подходящих оснований, включают соли щелочного металла (например, натрия, лития и калия), щелочноземельного металла (например, магния и кальция), аммония и $N^+(C_{1-4}алкил)_4$. Настоящее изобретение также предусматривает кватернизированные любые основные, азотсодержащие группы соединений, описываемых в данном описании. Воду или маслорастворимые или диспергируемые продукты могут быть получены

35 путем такой кватернизации.

[0064] Аддитивные соли оснований включают фармацевтически приемлемые соли металлов и аминов. Приемлемые соли металлов включают соли натрия, калия, кальция, бария, цинка, магния и алюминия. Соли натрия и калия являются особенно

40 предпочтительными. Дополнительно, фармацевтически приемлемые соли включают, когда это уместно, нетоксичные соли катионов аммония, четвертичного аммония и амина, сформированные с помощью катионов, таких как галоид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат. Приемлемые неорганические аддитивные соли оснований получают из металлических оснований, которые включают гидрид натрия, гидроксид натрия, гидроксид калия,

45 гидроксид кальция, гидроксид алюминия, гидроксид лития, гидроксид магния, гидроксид цинка и тому подобное. Приемлемые аддитивные соли аминных оснований получают из аминов, которые часто используются в медицинской химии, поскольку обладают низкой токсичностью и приемлемы для медицинского применения. Соли аммония,

этилендиамина, N-метил-глюкамина, лизина, аргинина, орнитина, холина, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, диэтаноламина, прокаина, N-бензилфенетиламина, амина, пиперазина, трис(гидроксиметил)аминометана, гидроксида тетраметиламмония, триэтиламина, dibензиламина, эфенамина, дегидроабиэтиламина, N-этилпиперидина, бензиламина, тетраметиламмония, тетраэтиламмония, метиламина, диметиламина, триметиламина, этиламина, основных аминокислот, дициклогексиламина и тому подобное являются примерами подходящих аддитивных солей оснований.

[0065] Другие кислоты и основания, хотя сами по себе не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы при получении солей, полезных в качестве промежуточных продуктов при получении соединений, описываемых в данном описании, и их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных и аддитивных солей оснований.

[0066] Следует понимать, что настоящее изобретение включает смеси/комбинации различных фармацевтически приемлемых солей, а также смеси/комбинации соединений в свободной форме и в форме фармацевтически приемлемой соли.

[0067] Соединения, описываемые в данном описании, также могут существовать в виде фармацевтически приемлемых сольватов (например, гидратов) и клатратов. Как используется в данном описании, термин "фармацевтически приемлемый сольват", представляет собой сольват, образованный при связывании одной или более фармацевтически приемлемых молекул растворителя с одним из соединений, описываемых в данном описании. Термин сольват включают гидраты (например, полугидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат, тетрагидрат и тому подобное).

[0068] Как используется в данном описании, термин "гидрат" означает соединение, описываемое в данном описании, или его соль, которые дополнительно включают стехиометрическое или нестехиометрическое количество воды, связанной нековалентными межмолекулярными силами.

[0069] Как используется в данном описании, термин "клатрат" означает соединение, описываемое в данном описании, или его соль в форме кристаллической решетки, которая содержит места (например, каналы), которые обладают гостевой молекулой (например, растворителя или воды), застрявшей внутри.

[0070] В дополнение к соединению, описываемому в данном описании, фармацевтически приемлемые производные или пролекарства этих соединений также могут использоваться в композициях для лечения и профилактики заболеваний, идентифицированных в данном описании.

[0071] "Фармацевтически приемлемое производное или пролекарство" включает любой фармацевтически приемлемый сложный эфир, соль сложного эфира или другое производное или его соль соединений, описываемых в данном описании, которые при введении пациенту способны образовывать, прямо или косвенно, соединение, описываемое в данном описании, или ингибиторно активный метаболит или его остаток. Особенно предпочтительными производными или пролекарствами являются такие, которые увеличивают биодоступность соединений, когда такие соединения вводятся пациенту (например, путем перорального введения соединения для более легкого всасывания в кровь), или которые усиливают доставку родоначального соединения к биологической полости (например, мозгу или в лимфатическую систему), относящейся к исходному виду.

[0072] Как используется в данном описании и если специально не указано иное, термин "пролекарство" означает производное соединения, которое может гидролизаться, окисляться или иным образом взаимодействовать в биологических условиях (*in vitro* или *in vivo*) с обеспечением соединения, описываемого в данном

описании. Пролекарства могут становиться активными при таких взаимодействиях в биологических условиях или они могут обладать активностью в их нереакционноспособных формах. Примеры пролекарств, предусмотренных в настоящем изобретении, включают, но, не ограничиваясь ими, аналоги или производные соединений по изобретению, которые содержат биогидролизуемые фрагменты, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые фосфатные аналоги. Другие примеры пролекарств включают производные соединений, описываемых в данном описании, которые включают -NO, -NO₂, -ONO или -ONO₂ фрагменты. Пролекарства, как правило, могут быть получены при применении общеизвестных способов, таких как описанные в BURGER'S MEDICINAL CHEMISTRY AND DRUG DISCOVERY (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed).

Терапевтическое применение

[0073] В одном из аспектов настоящего изобретения предоставлена комбинированная терапия, при которой ингибируется ATR путь, включающая соединение полезное для ингибирования ATR киназы, а также соединение, полезное для ингибирования Chk1 киназы (а.к.а. "ATR/Chk1 комбинированная терапия"). В некоторых вариантах осуществления соединение, полезное для ингибирования ATR, выбрано из группы, содержащей соединения формулы I или соединения формулы II. Данная комбинированная терапия полезна при лечении или уменьшении тяжести заболевания, состояния или расстройства, при котором путь ATR вовлечен в данное заболевание, состояние или расстройство.

[0074] В другом аспекте настоящего изобретения предоставлена комбинированная терапия, полезная для лечения заболеваний, расстройств или состояний, характеризующихся чрезмерной или аномальной пролиферацией, включая пролиферативные или гиперпролиферативные заболевания. Примеры пролиферативных или гиперпролиферативных заболеваний включают, но, не ограничиваясь ими, рак и миелолиферативные расстройства.

[0075] Термин "рак" включает, но, не ограничиваясь ими, следующие типы рака: горла, легких, желудочно-кишечного тракта, мочеполового тракта, печени, костей, нервной системы, гинекологический рак, рак кожи, щитовидной железы или надпочечников. Более конкретно, "рак" включает, но, не ограничиваясь ими, следующие типы рака: горла: ротовой полости, губ, языка, рта, глотки; сердца: саркома (ангиосаркома, фибросаркома, рабдомиосаркома, липосаркома), миксома, рабдомиома, фиброма, липома и тератома; легких: бронхогенная карцинома (плоскоклеточная или эпидермоидная, недифференцированная мелкоклеточная, недифференцированная крупноклеточная, аденокарцинома), альвеолярная (бронхиальная) карцинома, бронхиальная аденома, саркома, лимфома, хондроматозная гамартома, мезотелиома; желудочно-кишечного тракта: пищевода (аденокарцинома, плоскоклеточный рак, лейомиосаркома, гортани, лимфомы), желудка (рак, лимфомы, лейомиосаркома), поджелудочной железы (протоковая аденокарцинома, инсулинома, глюкагонома, гастринома, карциноидные опухоли, випома), тонкой кишки или тонкого кишечника (аденокарцинома, лимфома, карциноидные опухоли, саркома Капоши, лейомиома, гемангиома, липома, нейрофиброма, фиброма), толстой кишки или толстого кишечника (аденокарцинома, трубчатая аденома, ворсистой аденома, гамартома, лейомиома), толстой кишки, толстой кишки-прямой кишки, прямой кишки; мочеполового тракта: почки (аденокарцинома, опухоль Вильмса [нефробластома], лимфома, лейкоз), мочевого

пузыря и мочеиспускательного канала (плоскоклеточный рак, переходный рак, аденокарцинома), предстательной железы (аденокарцинома, саркома), семенников (семинома, тератома, эмбриональная карцинома, тератокарцинома, хориокарцинома, саркома, интерстициальная клеточная карцинома, фиброма, фиброаденома, аденоматоидные опухоли, липома); печени: гепатома (гепатоцеллюлярная карцинома), холангиокарцинома, гепатобластома, ангиосаркома, гепатоцеллюлярная аденома, гемангиома, рак желчных протоков; рак костей: остеогенная саркома (остеосаркома), фибросаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, хондросаркома, саркома Эвинга, злокачественная лимфома (ретикулярная клеточная саркома), множественная миелома, гигантоклеточная злокачественная опухолевая хордома, остеохронфома (остеохронфома) (костно-хрящевые шипы), доброкачественная хондрома, хондробластома, хондромиксофиброма, остеоидная остеома и опухоли гигантских клеток; нервной системы: рак черепа (остеома, гемангиома, гранулема, ксантома, остеомиелит деформирующий), мозговой оболочки (менингиома, менингиосаркома, глиоматоз), мозга (астроцитомы, медуллобластома, глиома, эпендимома, герминома [пинеалома], мультиформная глиобластома, олигодендроглиома, шваннома, ретинобластома, врожденные опухоли), нейрофиброма спинного мозга, менингиома, глиома, саркома); гинекологические типы рака: матки (карцинома эндометрия), шейки матки (цервикальная карцинома, предопухолевая цервикальная дисплазия), яичников (овариальная карцинома [серозная цистаденокарцинома, муцинозная цистаденокарцинома, неклассифицированные карциномы], гранулезные опухоли гнойных клеток, опухоли клеток Лейдига-Сертоли, дисгерминома, злокачественная тератома), рак вульвы (плоскоклеточная карцинома, интраэпителиальная карцинома, аденокарцинома, фибросаркома, меланома), влагалища (чистоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, ботриоидная саркома (эмбриональная рабдомиосаркома), маточных труб (карцинома), молочной железы; гематологические типы рака: рак крови (миелоидный лейкоз [острый и хронический], острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, миелопролиферативные заболевания, множественная миелома, миелодиспластический синдром), болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома [злокачественная лимфома] волосатых клеток, лимфоидные заболевания; рак кожи: злокачественная меланома, базальная клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, саркома Карпоши, кератоакантома, диспластическая хорноаденома родимого пятна, липома, ангиома, дерматофиброма, келоиды, псориаз; рак щитовидной железы: папиллярная карцинома щитовидной железы, фолликулярная карцинома щитовидной железы, недифференцированный рак щитовидной железы, медулярная карцинома щитовидной железы, множественная эндокринная неоплазия типа 2А, множественная эндокринная неоплазия типа 2В, семейная медулярный рак щитовидной железы, феохромоцитомы, параганглиома; и рак надпочечников: нейробластома.

[0076] В других вариантах осуществления рак выбран из рака легких, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака желудка или рака головного мозга. Еще в других вариантах осуществления рак выбран из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы, рака желчевыводящих путей, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака прямой кишки, глиобластомы, рака пищевода, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы или рака яичников. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из а рака легких или молочной железы. В еще других вариантах осуществления рак выбран из немелкоклеточного рака легких,

мелкоклеточного рака легких и трижды отрицательного рака молочной железы.

[0077] Термин "клеточный рак" как предоставлено в данном описании, включает клетку, пораженную одним из приведенных выше состояний. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака прямой кишки, щитовидной железы, легких или

5

рака молочной железы.
[0078] Термин "миелопролиферативные расстройства", включают расстройства, такие как истинная полицитемия, тромбоцитемия, миелоидная метаплазия с миелофиброзом, гиперэозинофильный синдром, миеломоноцитная лейкемия несовершеннолетних, системное заболевание тучных клеток и гематопоэтические

10

расстройства, в частности, острый миелобластный лейкоз (AML), хронический миелолейкоз (СМL), острый промиелоцитарный лейкоз (APL) и острый лимфобластный лейкоз (ALL).

Фармацевтические композиции

[0079] Настоящее изобретение также предоставляет комбинированную терапию, включающую соединение или композицию, полезную для ингибирования АТR киназы, и соединение или композицию, полезную для ингибирования Chk1 киназы.

15

[0080] В одном из аспектов настоящего изобретения предоставлена комбинированная терапия, включающая композицию, полезную для ингибирования АТR киназы, и композицию, полезную для ингибирования Chk1 киназы, как описано в данном описании. Каждая композиция необязательно содержит фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

20

[0081] Фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель, как используется в данном описании, включают любое из растворителей, разбавителей или других жидких наполнителей, диспергирующих или суспендирующих добавок, поверхностно-активных веществ, изотонических агентов, сгущающих или эмульгирующих агентов, консервантов, твердых связующих, лубрикантов и тому подобное, в зависимости от конкретной желаемой лекарственной формы. В Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) описаны различные носители, используемые при формулировании фармацевтически приемлемых композиций, и известные методики для их получения. За исключением случаев, при которых любая общепринятая среда носителя является несовместимой с соединениями по изобретению, таких, которые вызывают любой нежелательный биологический эффект или иное пагубное взаимодействие с любым другим компонентом фармацевтически приемлемой композиции, что принять во

25

30

35

внимание при включении в объем настоящего изобретения.
[0082] Некоторые примеры веществ, которые могут быть представлены в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, но, не ограничиваясь ими, ионообменные вещества, окись алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбат калия или сорбиновая кислота, смеси частичных глицеридов растительных насыщенных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, динатрийгидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилена-полиоксипропилена, шерстяной жир, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошок трагаканта; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и суппозиторные

40

45

воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферизирующие агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и забуференные фосфатом растворы, а также другие нетоксичные совместимые лубриканты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, при этом в композиции также могут присутствовать красители, высвобождающие агенты, покрывающие агенты, подсластители, придающие вкус и аромат агенты, консерванты и антиоксиданты согласно решению составителя композиции.

[0083] Ингибиторы ATR и Chk1 киназы или их фармацевтические соли могут быть сформулированы в фармацевтические композиции для введения животным или людям. Такие фармацевтические композиции, которые содержат соответствующее количество ингибитора ATR и Chk1, эффективное для лечения и профилактики заболеваний или состояний, описываемых в данном описании, и фармацевтически приемлемый носитель, описаны выше.

[0084] Точное количество соединений, необходимое для лечения, будет варьироваться от пациента к пациенту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния пациента, тяжести инфекции, конкретного агента, режима его введения и тому подобное. Соединения по изобретению предпочтительно формулируют в единичную лекарственную форму для облегчения введения и унифицирования дозирования. Выражение "единичная лекарственная форма", как используется в данном описании, относится к физической дискретной единице средства, подходящего для подвергаемого лечению пациента. Однако следует понимать, что общее ежедневное дозирование соединениями и композициями настоящего изобретения будет решаться лечащим врачом по результатам тщательной медицинской оценки. Уровень конкретной эффективной дозы для любого конкретного пациента или организма будет зависеть от целого ряда факторов, включающих подвергаемое лечению расстройство и тяжесть расстройства; активность конкретно применяемого соединения; конкретно применяемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время, путь введения и скорость выведения конкретно применяемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации, или симптоматичность с конкретным применяемым соединением и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Термин "пациент", как используется в данном описании, означает животное, предпочтительно млекопитающее, и более предпочтительно человека.

[0085] В некоторых вариантах осуществления такие композиции необязательно дополнительно содержат одно или более дополнительных терапевтических средств. Например, химиотерапевтические средства или другие антипролиферативные средства могут быть комбинированы с соединениями настоящего изобретения для лечения пролиферативных заболеваний и рака. Примеры известных средств, с которыми настоящие композиции можно комбинировать, перечислены ниже в разделе "Дополнительные терапевтические средства", а также по всему данному описанию. В некоторых вариантах осуществления предоставлено совместное, раздельное или последовательное применение комбинированного препарата.

Дополнительные терапевтические средства

[0086] Другой аспект настоящего изобретения непосредственно направлен на способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение соединения,

полезного для ингибирования ATR киназы; введение соединения, полезного для ингибирования Chk1 киназы, и введение одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления указанный способ при ATR/Chk1 комбинированной терапии включает последовательное или совместное
5 введение настоящих соединений или композиций и дополнительного терапевтического средства.

[0087] Как используется в данном описании, термин "в комбинации" или "совместное введение" может использоваться взаимозаменяемо при обозначении применения более чем одной терапии (например, одного или более терапевтических средств).

10 Использование данного термина не ограничивает порядка проведения каждой из терапий (например, терапевтических средств) при введении пациенту.

[0088] В некоторых вариантах осуществления указанным дополнительным терапевтическим средством является противораковое средство. В других вариантах осуществления указанное дополнительное терапевтическое средство представляет собой повреждающее ДНК средство. Будет понятно, что дополнительное
15 терапевтическое средство может включать одну или более терапий. Еще в других вариантах осуществления указанное дополнительное терапевтическое средство выбрано из радиационной терапии, химиотерапии или других средств, обычно используемых в комбинации с радиационной терапией или химиотерапией, таких как
20 радиосенсибилизаторы и хемосенсибилизаторы. Еще в других вариантах осуществления указанным дополнительным терапевтическим средством является ионизирующее излучение. В некоторых вариантах осуществления указанное дополнительное терапевтическое средство включает ионизирующее излучение и повреждающее ДНК средство.

[0089] Как известно специалисту в данной области техники, радиосенсибилизаторы представляют собой средства, которые могут быть использованы в комбинации с радиационной терапией. Радиосенсибилизаторы работают в различных отличающихся
25 направлениях, включая, но, не ограничиваясь ими, придание раковым клеткам большей чувствительности к радиационной терапии, работу в тесном взаимодействии с радиационной терапией для обеспечения улучшенного синергического эффекта, действуя аддитивно с радиационной терапией или защищая окружающие здоровые клетки от повреждений, вызванных радиационной терапией. Аналогичным образом,
30 хемосенсибилизаторы представляют собой средства, которые могут быть использованы в комбинации с химиотерапией. Подобным образом, хемосенсибилизаторы работают в различных отличающихся направлениях, включая, но, не ограничиваясь ими, придание раковым клеткам большей чувствительности к химиотерапии, работу в тесном взаимодействии с химиотерапией для обеспечения улучшенного синергического эффекта, действуя аддитивно с химиотерапией или защищая окружающие здоровые клетки от повреждений, вызванных химиотерапией.

[0090] Примеры повреждающих ДНК средств, которые можно использовать при ATR/Chk1 комбинированной терапии настоящего изобретения, включают, но, не ограничиваясь ими, платинирующие средства, такие как карбоплатин, оксалиплатин, цисплатин, надаплатин, сатраплатин, лобаплатин, триплатин, тетранитрат, пикоплатин, пролиндак, ароплатин и другие производные; ингибиторы Торо I, такие как камптотецин, топотекан, иринотекан/sn38, рубитекан, белотекан и другие производные; ингибиторы Торо II, такие как этопозид (VP-16), даунорубицин, доксоорубицин, митоксантрон, акларубицин, эпирубицин, идарубицин, амрубицин, амсакрин, пирарубицин, валрубицин, зорубицин, тенипозит и другие производные; антиметаболиты, такие как семейство

фолатов (метотрексат, пеметрексед, ралтитрексед, аминоптерин и родственные формы);
 пуриновые антагонисты (тиогуанин, флударабин, кладрибин, 6-меркаптопурин,
 пентостатин, клофарабин и родственные формы) и пиримидиновые антагонисты
 (цитарабин, флосуридин, азациитидин, тегуфар, кармофур, капацитабин, гемцитабин,
 5 гидроксимочевина, 5-фторурацил(5FU) и родственные формы); алкилирующие агенты,
 такие как азотистый иприт (например, циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил,
 мехлоретамин, ифосфамид, мехлоретамин, трофосфамид, преднимустин, бендамустин,
 урамустин, эстрамустин и родственные формы); нитрозомочевина (например, кармустин,
 ломустин, семустин, фотемустин, нимустин, ранимустин, стрептозоцин и родственные
 10 формы); триазены (например, дакарбазин, альтретамин, темозоломид и родственные
 формы); алкилсульфонаты (например, бусульфан, манносульфат, треосульфат и
 родственные формы); прокарбазин; митобронитол и азиридины (например, карбоквон,
 триазиквон, тиотепа, триэтиленемаламин и родственные формы); антибиотики, такие
 как гидроксимочевина, антрациклины (например, доксоорубицин, даунорубицин,
 15 эпирубицин и другие производные); антрацендионы (например, митоксантрон и
 родственные формы); семейство стрептомицетов (например, блеомицин, митомицин с,
 актиномицин, пликамицин); и ультрафиолетовое облучение.

[0091] Другие терапии или противораковые средства, которые можно использовать
 в комбинированной терапии, включают хирургию, радиационную терапию (в качестве
 20 нескольких примеров, гамма-облучение, радиационная терапия нейтронным пучком,
 радиационная терапия пучком электронов, протонная терапия, брахитерапия и
 системными радиоактивными изотопами), эндокринную терапию, модификаторы
 биологического ответа (например, интерфероны, интерлейкины и фактор некроза
 опухоли (TNF)), гипертермию и криотерапию, средства для смягчения любых
 25 неблагоприятных последствий (например, противорвотные средства), и другие
 утвержденные химиотерапевтические лекарственные препараты, включая, но, не
 ограничиваясь ими, повреждающие ДНК средства, перечисленные в данном описании,
 веретенные яды (винбластин, винкристин, винорелбин, паклитаксел), подофиллотоксины
 (этопозид, иринотекан, топотекан), нитрозомочевину (кармустин, ломустин),
 30 неорганические ионы (цисплатин, карбоплатин), ферменты (аспарагиназа) и гормоны
 (тамоксифен, лейпролид, флутамид и мегестрол), Gleevec™, адриаамицин, дексаметазон
 и циклофосфамид.

[0092] При других комбинированных терапиях настоящего изобретения можно
 использовать любое из следующих терапевтических средств: абареликс (Plenaxis depot[®]);
 35 альдеслейкин (Prokine[®]); альдеслейкин (Proleukin[®]); алемтузумаб (Campath[®]);
 алитретиноин (Panretin[®]); аллопуринол (Zyloprim[®]); альтретамин (Hexalen[®]); амифостин
 (Ethyol[®]); анастрозол (Arimidex[®]); триоксид мышьяка (Tricenox[®]); аспарагиназу (Elspar[®]);
 40 азациитидин (Vidaza[®]); бевакузумаб (Avastin[®]); капсулы бексаротена (Targretin[®]);
 бексаротена гель (Targretin[®]); блеомицин (Blenoxane[®]); бортезомиб (Velcade[®]); бусульфан
 внутривенно (Busulfex[®]); бусульфан перорально (Myleran[®]); калустерон (Methosarb[®]);
 капецитабин (Xeloda[®]); карбоплатин (Paraplatin[®]); кармустин (BCNU[®], BiCNU[®]);
 45 кармустин (Gliadel[®]); кармустин с полифепрозаном 20 имплант (Gliadel Wafer[®]);
 целекоксиб (Celebrex[®]); цетуксимаб (Erbix[®]); хлорамбуцил (Leukeran[®]); цисплатин
 (Platinol[®]); кладрибин (Leustatin[®], 2-CdA[®]); клофарабин (Clolar[®]); циклофосфамид

(Cytoxan[®], Neosar[®]); циклофосфамид (Cytoxan Injection[®]); циклофосфамид (Cytoxan Tablet[®]); цитарабин (Cytosar-U[®]); цитарабин липосомальный (DepoCyt[®]); дакарбазин (DTIC-Dome[®]); дактиномицин, актиномицин D (Cosmegen[®]); дарбепэтин альфа (Aranesp[®]); даунорубицин липосомальный (DanuoXome[®]); даунорубицин, дауномицин (Daunorubicin[®]); даунорубицин, дауномицин (Cerubidine[®]); денилейкин дифтитокс (Ontak[®]); дексразоксан (Zinecard[®]); доцетаксел (Taxotere[®]); доксоорубицин (Adriamycin PFS[®]); доксоорубицин (Adriamycin[®], Rubex[®]); доксоорубицин (Adriamycin PFS Injection[®]); доксоорубицин липосомальный (Doxil[®]); дромостанолон пропионат (dromostanolone[®]); дромостанолон пропионат (masterone injection[®]); раствор Эллиота В (Elliott's B Раствор[®]); эпирубицин (Ellence[®]); эпоэтин альфа (epogen[®]); эрлотиниб (Tarceva[®]); эстрамустин (Emcyt[®]); этопозид фосфат (Etoporphos[®]); этопозид, VP-16 (Vepesid[®]); эксеместан (Aromasin[®]); филграстим (Neupogen[®]); флоксуридин (внутриартериально) (FUDR[®]); флударабин (Fludara[®]); фторурацил, 5-FU (Adrucil[®]); филвестрант (Faslodex[®]); gefитиниб (Iressa[®]); гемцитабин (Gemzar[®]); гемтузумаб-озогамицин (Mylotarg[®]); гозерелина ацетат (Zoladex Implant[®]); гозерелина ацетат (Zoladex[®]); гистрелина ацетат (Histrelin implant[®]); гидроксимочевину (Hydrea[®]); ибритумомаб тиуксетан (Zevalin[®]); идарубицин (Idamycin[®]); ифосфамид (IFEX[®]); иматиниба мезилат (Gleevec[®]); интерферон альфа 2a (Roferon A[®]); иИнтерферон альфа-2b (Intron A[®]); иринотекан (Camptosar[®]); леналидомид (Revlimid[®]); летрозол (Femara[®]); лейковорин (Wellcovorin[®], Leucovorin[®]); лейпролида ацетат (Eligard[®]); левамизол (Ergamisol[®]); ломустин, CCNU (CeeBU[®]); меклоретамин, азотистый иприт (Mustargen[®]); мегэстрола ацетат (Megace[®]); мелфалан, L-РАМ (Alkeran[®]); меркаптопурин, 6-MP (Purinethol[®]); месны (Mesnex[®]); месны (Mesnex tabs[®]); метотрексат (Methotrexate[®]); метоксален (Uvadex[®]); митомицин С (Mutamycin[®]); митотан (Lysodren[®]); митоксантрон (Novantrone[®]); нандролона фенпропионат (Durabolin-50[®]); неларабин (Arranon[®]); нофетумомаб (Verluma[®]); опрелвекин (Neumega[®]); оксалиплатин (Eloxatin[®]); паклитаксел (Paxene[®]); паклитаксел (Taxol[®]); паклитаксел протеин-связанные частицы (Абрахане[®]); палифермин (Керивансе[®]); памидронат (Aredia[®]); пегадемас (Adagen (Pegademase Bovine)[®]); пегаспаргас (Oncaspar[®]); пегфилграстим (Neulasta[®]); пеметрекседа динатрий (Alimta[®]); пентостатин (Nipent[®]); пипоброман (Vercyte[®]); пликамицин, митрамицин (Mithracin[®]); порфимер натрия (Photofrin[®]); прокарбазин (Matulane[®]); квинакрин (Atabrine[®]); расбуриказу (Elitek[®]); ритуксимаб (Rituxan[®]); сарграмостим (Leukine[®]); сарграмостим (Prokine[®]); сорафениб (Nexavar[®]); стрептозоцин (Zanosar[®]); санитиниба малеат (Sutent[®]); тальк (Sclerosol[®]); тамоксифен (Nolvadex[®]); темозоломид (Temodar[®]); тенипозит, VM-26 (Vumon[®]); тестолактон (Teslac[®]); тиогуанин, 6-TG (Thioguanine[®]); тиотепа (Thioplex[®]); топотекан (Нусамтин[®]); торемифен (Fareston[®]); тозитумомаб (Веххар[®]); тозитумомаб/1-131 тозитумомаб (Веххар[®]);

трастузумаб (Herceptin[®]); третиноин, ATRA (Vesanoid[®]); урамустин (Uracil Mustard Капсулы[®]); валрубидин (Valstar[®]); винбластин (Velban[®]); винкрестин (Oncovin[®]); винорелбин (Navelbine[®]); золедронат (Zometa[®]) и воринастат (Zolinza[®]).

5 [0093] Для всестороннего обсуждения обновленной раковой терапии см., <http://www.nci.nih.gov/>, список FDA утвержденных онкологических препаратов на <http://www.fda.gov/cder/pak/druglistframe.htm>, и The Merck Manual, Seventeenth Ed. 1999, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки.

[0094] В другом варианте осуществления дополнительным терапевтическим средством
10 может быть соединение или композиция, которая ингибирует или модулирует эксцизионную репарацию оснований белка. В некоторых вариантах осуществления эксцизионная репарация оснований белка выбрана из UNG, SMUG1, MBD4, TDG, OGG1, МУН, NTH1, MPG, NEIL1, NEIL2, NEIL3 (ДНК гликозилаза); APE1, APEX2 (AP эндонуклеаза); LIG1, LIG3 (ДНК лигаза I и III); XRCC1 (LIG3 добавочная); PNK, PNKP
15 (полинуклеотидная киназа и фосфатаза); PARP1, PARP2 (поли(ADP-рибоза)полимераза); PolB, PolG (полимераза); FEN1 (эндонуклеаза) или апраксин. В других вариантах осуществления эксцизионная репарация оснований белка выбрана из PARP1, PARP2 или PolB. Еще в других вариантах осуществления эксцизионная репарация оснований
20 белка выбрана из PARP1 или PARP2. В других вариантах осуществления средство, которое ингибирует или модулирует PARP1 или PARP2, выбрано из олапариба (также известного как AZD2281 или KU-0059436), инипариба (также известного как BSI-201 или SAR240550), велипариба (также известного как АВТ-888), рукапариба (также известного как PF-01367338), CEP-9722, INO-1001, МК-4827, E7016, BMN673 или AZD2461.

[0095] В другом варианте осуществления предоставлен способ лечения рака,
25 включающий введение соединения, полезного для ингибирования Chk1 киназы; введение соединения, полезного для ингибирования ATR киназы; введение соединения, полезного для ингибирования или модуляции PARP1 или PARP2; и введение повреждающего ДНК средства. В другом варианте осуществления повреждающее ДНК средство выбрано из ионизирующего излучения или цисплатина. В некоторых вариантах осуществления
30 повреждающим ДНК средством является цисплатин. В других вариантах осуществления повреждающим ДНК средством является ионизирующее излучение. В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует или модулирует PARP1 или PARP2, выбрано из олапариба (также известного как AZD2281 или KU-0059436), инипариба (также известного как BSI-201 или SAR240550), велипариба (также известного
35 как АВТ-888), рукапариба (также известного как PF-01367338), CEP-9722, INO-1001, МК-4827, E7016, BMN673 или AZD2461. В других вариантах осуществления средством, которое ингибирует или модулирует PARP1 или PARP2, является велипариб (также известный как АВТ-888) или рукапариб.

Способы введения и лекарственные формы

40 [0096] Фармацевтически приемлемые композиции настоящего изобретения могут вводиться человеку и другим животным перорально, ректально, парентерально, интрацестернально, внутривагинально, внутрибрюшинно, местно (в виде порошков, мазей или капель), буккально, в виде перорального или назального спрея или подобного, в зависимости от тяжести инфекции, подвергаемой лечению. В некоторых вариантах
45 осуществления соединения по изобретению могут быть введены перорально или парентерально при уровне доз примерно от 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг и предпочтительно от примерно 1 мг/кг до примерно 25 мг/кг массы тела пациента на дозу для получения желаемого терапевтического эффекта.

[0097] Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают, но, не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, ростков пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, сложные сорбитановые эфиры полиэтиленгликолей и жирной кислоты, и их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции также могут содержать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, придающие вкус и аромат агенты.

[0098] Инъецируемые препараты, например, стерильные инъецируемые водные или маслянистые суспензии могут быть сформулированы согласно известному в данной области использованию подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный инъецируемый препарат также может представлять собой стерильный инъецируемый раствор, суспензию или эмульсию в нетоксичном, подходящем для парентерального введения разбавителе или растворителе, например, такой как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди подходящих наполнителей и растворителей, которые могут быть использованы, находятся вода, раствор Рингера, U.S.P. и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно используются в качестве растворяющей или суспендирующей среды. Для этих целей может быть использовано любое легкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, могут использоваться при получении инъецируемых препаратов.

[0099] Инъецируемые составы могут быть стерилизованы, например, фильтрованием через удерживающий бактериальный фильтр или включением стерилизующих агентов при формировании стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъецируемой среде непосредственно перед применением.

[00100] Для продления действия соединений настоящего изобретения, часто желательно замедлить поглощение соединения из подкожных или внутримышечных инъекций. Это может быть достигнуто путем использования жидкой суспензии кристаллических или аморфных веществ с плохой растворимостью в воде. Скорость поглощения соединения, когда зависит от скорости растворения, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно, отсроченное поглощение формы парентерально вводимого соединения осуществляется путем растворения или суспендирования соединения в масляном наполнителе. Инъекционные депо формы получают путем формирования микроинкасулированной матрицы соединения в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения соединения к полимеру и природы конкретно используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения соединения. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(сложные ортоэфиры) и поли(ангидриды). Депо инъецируемые составы также получают путем включения соединения в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

[00101] Композиции для ректального или вагинального введения предпочтительно представляют собой суппозитории, которые могут быть получены смешиванием

соединения настоящего изобретения с подходящими нераздражающими эксципиентами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при температуре тела, и поэтому расплавляются в полости влагалища или прямой кишке и высвобождают активное соединение.

[00102] Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение смешивают по меньшей мере с одним инертным, фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем, таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или а) наполнителями или модифицирующими агентами, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующими, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и аравийская камедь, в) увлажнителями, такими как глицерин, д) диспергирующими агентами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия, е) замедляющими растворение агентами, такими как парафин, ф) ускорителями абсорбции, такими как четвертичные аммониевые соединения, г) смачивающими агентами, такими как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина, h) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина, и i) лубрикантами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль, лекарственная форма также может содержать буферизирующие агенты.

[00103] Твердые композиции такого типа также могут использоваться в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах при использовании таких эксципиентов, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть получены с покрытием и оболочками, такими как энтеральные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области составления фармацевтических композиций. Они могут необязательно содержать светонепроницаемые агенты, а также могут представлять собой композицию, которая высвобождает активный ингредиент(ы), только или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, замедленным образом. Примеры таких инвариантных композиций, которые могут быть использованы, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции такого типа, также могут использоваться в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах при использовании таких эксципиентов, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное.

[00104] Активные соединения также могут быть инкапсулированы с одним или более эксципиентами, как указано выше. Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть получены с покрытиями и оболочками, такими как энтеральные покрытия, покрытия с контролируемым высвобождением и другие покрытия, хорошо известные в области составления фармацевтических композиций. В таких твердых лекарственных формах активное соединение может быть смешано по меньшей мере с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы также могут содержать, как это принято в нормальной практике, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например, лубриканты для таблетирования и другие таблетизирующие добавки, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и

пилюль, лекарственные формы также могут содержать буферизирующие агенты. Они могут необязательно содержать светонепроницаемые агенты, а также могут представлять собой композицию, которая высвобождает активный ингредиент(ы), только или предпочтительно, в определенной части кишечного тракта, необязательно, замедленным образом. Примеры таких инвариантных композиций, которые могут быть использованы, включают полимерные вещества и воски.

[00105] Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения настоящего изобретения включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, ингаляторы или пластыри. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и любыми необходимыми консервантами или буферами, как может потребоваться. Офтальмологический состав, ушные капли и глазные капли также рассматривается, как входящие в объем настоящего изобретения. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает использование трансдермальных пластырей, которые имеют дополнительное преимущество в обеспечении контролируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования соединения в соответствующей среде. Также могут использоваться усилители абсорбции для увеличения проникновения соединения через кожу. Скорость можно контролировать либо с помощью мембраны, обеспечивающей контроль скорости, или путем диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

[00106] Композиции настоящего изобретения могут быть введены перорально, парентерально, ингаляционным спреем, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через резервуарный имплант. Термин "парентеральный", как используется в данном описании, включает, но, не ограничиваясь ими, подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутрисуставные, интрасиновиальные, внутригрудинные, интратекальные, внутрипеченочные, внутриочаговые и внутричерепные инъекционные или инфузионные методы. Предпочтительно, данные композиции вводят перорально, внутрибрюшинно или внутривенно.

[00107] Стерильные инъекционные формы композиций настоящего изобретения могут представлять собой водные или маслянистые суспензии. Такие суспензии могут быть изготовлены согласно методикам, известным в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворе, например, как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди подходящих наполнителей и растворителей, которые могут быть использованы, присутствуют вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно используются в качестве растворяющей или суспендирующей среды. Для этих целей, может быть использовано любое легкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, полезны при получении инъекционных препаратов, которыми являются природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксиэтилатных вариантах. Такие масляные растворы или суспензии также могут содержать длинноцепочечный спиртовой разбавитель или диспергатор, такой как карбоксиметилцеллюлоза или подобные диспергирующие агенты, которые обычно используются при изготовлении фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Для целей составления фармацевтических композиций

также можно использовать поверхностно-активные вещества, такие как твины, спаны и другие эмульгирующие агенты или биодоступные усилители, которые обычно используются при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм.

5 [00108] Фармацевтические композиции настоящего изобретения можно вводить перорально в любой перорально приемлемой лекарственной форме, включая, но, не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае
10 таблеток для перорального применения, обычно используемые носители включают, но, не ограничиваясь ими, лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляются лубриканты, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсул,
15 полезные разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Когда водные суспензии требуются для перорального применения, активный ингредиент комбинируют с эмульгирующим и суспендирующим агентами. При желании, также могут добавляться некоторые подсластители, придающие вкус или красящие агенты.

15 [00109] Альтернативно, фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть введены в форме суппозиторий для ректального введения. Они могут быть получены смешиванием данного агента с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при ректальной
20 температуре и поэтому будет плавиться в прямой кишке, высвобождая при этом лекарственное средство. Такие вещества включают, но, не ограничиваясь ими, масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

[00110] Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут быть введены местно, особенно, когда мишень лечения включает области или органы, легкодоступные для топического применения, включая заболевания глаз, кожи или
25 нижнего кишечного тракта. Подходящие составы для местного применения легко изготавливаются для каждой из указанных областей или органов.

[00111] Местное применение для нижнего кишечного тракта может быть эффективно в ректальной суппозиторной форме (см. выше) или в виде подходящей клизмы. Также могут быть использованы местные трансдермальные пластыри.

30 [00112] Для топического применения, фармацевтические композиции могут быть сформулированы в подходящую мазь, содержащую активный компонент, суспендированный или растворенный в одном или более носителях. Носители для местного введения соединений настоящего изобретения включают, но, не ограничиваясь ими, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль,
35 полиоксиэтилен, полиоксипропиленовое соединение, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно, фармацевтические композиции могут быть сформулированы в подходящий лосьон или крем, содержащий активные компоненты, суспендированные или растворенные в одном или более фармацевтически приемлемых носителях. Подходящие носители включают, но, не ограничиваясь ими, минеральное масло,
40 моностеарат сорбитана, полисорбат 60, цетиловые сложные эфиры воска, цетариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

[00113] Для офтальмологического применения фармацевтические композиции могут быть сформулированы в виде микронизированной суспензии в изотоническом, с поддерживаемым рН стерильном солевом растворе, или предпочтительно в виде
45 растворов в изотоническом, с поддерживаемым рН стерильном солевом растворе, с или без консервантов, таких как бензалконийхлорид. Альтернативно, для офтальмологического применения, фармацевтические композиции могут быть сформулированы в виде мази, такой как вазелин.

[00114] Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут быть введены путем назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции получают согласно методикам, хорошо известным в области составления фармацевтических композиций, и могут быть получены в виде растворов в физиологическом растворе, при использовании бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для усиления биодоступности, фторуглеродов и/или других общепринятых солюбилизирующих или диспергирующих агентов.

[00115] Количество ингибитора протеинкиназы, которое может быть комбинировано с материалами носителя для изготовления единичной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению хозяина, особенно режима введения. Предпочтительно, композиции должны быть сформулированы таким образом, чтобы доза, составляющая от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/доза ингибитора, могла быть введена пациенту, получающему такие композиции.

[00116] Также следует понимать, что конкретное дозирование и режим лечения для какого-либо конкретного пациента будет зависеть от различных факторов, включающих активность конкретно применяемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств и решения лечащего врача, и тяжести конкретного заболевания, подвергаемого лечению. Количество ингибитора будет также зависеть от того или иного соединения в данной композиции.

Биологические образцы

[00117] В качестве ингибиторов пути ATR, соединения и композиции настоящего изобретения также являются полезными в биологических образцах. Один из аспектов настоящего изобретения относится к ингибированию активности ATR и Chk1 киназы в биологическом образце, способ которого включает приведение в контакт указанного биологического образца с соединением, которое ингибирует активность ATR киназы, и соединения, которое ингибирует активность Chk1 киназы. Альтернативно, могут быть использованы отдельные композиции, содержащие такие соединения. Термин "биологический образец", как используется в данном описании, означает образец *in vitro* или *ex vivo*, включающий, но без ограничения, культуры клеток или их экстракты; биопсийный материал, полученный от млекопитающего, или его экстракты; и кровь, слюну, мочу, кал, семенную жидкость, слезы или другие жидкости из организма или их экстракты. Термин "соединения" включает соединения формулы I и формулы II.

[00118] Ингибирование активности ATR и Chk1 киназы в биологическом образце полезно для различных целей, которые известны специалисту в данной области техники. Примеры таких целей включают, но, не ограничиваясь ими, переливание крови, трансплантацию органов и хранение биологического материала.

Исследование протеинкиназ

[00119] Другой аспект настоящего изобретения относится к исследованию протеинкиназ при биологических и патологических явлениях; исследованию внутриклеточных путей передачи сигналов при посредничестве таких протеинкиназ; и сравнительной оценке новых ингибиторов протеинкиназ. Примеры таких применений включают, но, не ограничиваясь ими, биологические анализы, такие как ферментный анализ и функциональный клеточный анализ.

[00120] Активность данных соединений в качестве ингибиторов протеинкиназы можно проанализировать *in vitro*, *in vivo* или на клеточной линии. *In vitro* анализы включают анализ, по которому определяют ингибирование активированной киназы либо активной киназы или активной АТФазы. Альтернативный *in vitro* количественный

анализ на способность ингибитора связываться с протеинкиназой, которая может быть измерена либо по радиоактивной метке ингибитора до связывания при изолировании комплекса ингибитор/киназа, и определено количество радиоактивного связывания, или путем запуска конкурентного эксперимента, в котором новые ингибиторы инкубируют со связанной с известными радиолигандами киназой. Подробные условия для исследования соединений, используемых в настоящем изобретении в качестве ингибитора ATR, приведены в примерах ниже.

Способы лечения

[00121] В одном из аспектов настоящее изобретение предоставляет способ лечения рака у пациента, включающий введение соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу; и введение соединения, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу ("ATR/Chk1 комбинированная терапия").

[00122] В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способ лечения рака у пациента, включающий введение соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу; введение соединения, которое ингибирует Chk 1 протеинкиназу; и введение одного или более дополнительных терапевтических средств, независимо выбранных из повреждающего ДНК средства, где дополнительное терапевтическое средство подходит для заболевания, подвергаемого лечению; и дополнительное терапевтическое средство вводят вместе с данным соединением в виде единичной лекарственной формы или раздельно с данным соединением в виде части множественной дозированной формы.

[00123] В некоторых вариантах осуществления повреждающее ДНК средство независимо выбрано из химиотерапии или радиационной терапии.

[00124] В другом варианте осуществления повреждающее ДНК средство выбрано из ионизирующего излучения, радиомимического неокарциностана, платинирующего средства, ингибитора Торо I, ингибитора Торо II, антиметаболита, алкилирующего агента, алкилсульфонатов, антиметаболита или антибиотика. В других вариантах осуществления указанное повреждающее ДНК средство выбрано из ионизирующего излучения, платинирующего средства, ингибитора Торо I, ингибитора Торо II, антиметаболита, алкилирующего агента или алкилсульфоната.

[00125] Еще в другом варианте осуществления указанное платинирующее средство независимо выбрано из цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина, недаплатина, лобоплатина, триплатина, тетранитрата, пикоплатина, сатраплатина, пролиндака и ароплатина; указанный ингибитор Торо I выбран из камптотецина, топотекана, иринотекана/sn38, рубитекана и белотекана; указанный ингибитор Торо II выбран из этопозиды, даунорубицина, доксоорубицина, акларубицина, эпирубицина, идарубицина, амрубицина, пирарубицина, валрубицина, зорубицина и тенипозита; указанный антиметаболит выбран из аминоптерина, метотрексата, пеметрекседа, раллитрекседа, пентостатина, кладрибина, клофарабина, флударабина, тиогуанина, меркаптопурина, фтопурацила, капецитабина, тегуфара, кармофура, флоксуридина, цитарабина, гемцитабина, азациитидина и гидроксимочевины; указанный алкилирующий агент выбран из мехлоретамина, циклофосфамида, ифосфаамида, трофосфамида, хлорамбуцила, мелфалана, преднимустина, бендамустина, урамустина, эстрамустина, кармустина, ломустина, семустина, фотемустина, нимустина, ранимустина, стрептозоцина, бусульфана, манносульфана, треосульфана, карбоквона, тиотепа, триазиквона, триэтиленэмеламина, прокарбазина, дакарбазина, темозоломида, альтретамина, митобронитола, актиномицина, блеомицина, митомицина и пликамицина.

[00126] Еще в других вариантах осуществления указанное платинирующее средство независимо выбрано из цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина, недаплатина или

сатраплатина; указанный ингибитор Торо I выбрано из камптотецина, топотекана, иринотекан/SN38, рубитекана; указанный ингибитор Торо II выбран из этопозиды; указанный антиметаболит выбран из метотрексата, пеметрекседа, тиогуанина, флударабина, кладрибина, цитарабина, гемцитабина, 6-меркаптопурина или 5-фторурацила; указанный алкилирующий агент выбран из азотистого иприта, нитрозомочевины, триазены, алкилсульфонатов, прокарбазина или азиридинов; и указанный антибиотик выбран из гидроксимочевины, антрациклинов, антрацендионов или семейства стрептомицетов.

[00127] В некоторых вариантах осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой платинирующее средство. В других вариантах осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой платинирующее средство, выбранное из цисплатина. Еще в других вариантах осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой платинирующее средство, выбранное из карбоплатина.

[00128] Еще в другом варианте осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой ионизирующее излучение.

[00129] Еще в других вариантах осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой антиметаболит, выбранный из гемцитабина.

[00130] В некоторых вариантах осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой ингибитор Торо I, выбранный из камптотецина, топотекана, иринотекан/sn38, рубитекана или белотекана.

[00131] В других вариантах осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой ингибитор Торо II, выбранный из этопозиды.

[00132] Еще в других вариантах осуществления повреждающее ДНК средство представляет собой алкилирующий агент, выбранный из темозоломида.

[00133] Еще в других вариантах осуществления повреждающее ДНК средство выбрано из одного или более из следующих: цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, этопозиды, темозоломида или ионизирующего излучения. В других вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является цисплатин или карбоплатин.

[00134] В некоторых вариантах осуществления ATR/Chk1 комбинированная терапия комбинирована с химиорадиационной терапией, химиотерапией и/или радиационной терапией. Как будет понятно специалисту в данной области техники, химиорадиационная терапия относится к лечебному режиму, включающему как химиотерапию (такую как цисплатин) и радиооблучение. В некоторых вариантах осуществления химиотерапией является цисплатин.

[00135] В одном или нескольких вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, выбранную из следующих типов рака: рака горла, легких, желудочно-кишечного тракта, мочеполовых путей, печени, костей, нервной системы, гинекологического рака, кожи, щитовидной железы или рака надпочечников.

[00136] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, выбранную из следующих типов рака: перорального рака: ротовой полости, губ, языка, горла, глотки; рака сердца: саркома (ангиосаркома, фибросаркома, рабдомиосаркома, липосаркома), миксома, рабдомиома, фиброма, липома и тератома; рака легких: бронхогенная карцинома (плоскоклеточная или эпидермоидная, недифференцированная мелкоклеточная, недифференцированная крупноклеточная, аденокарцинома), альвеолярная (бронхиолярная) карцинома, бронхиальная аденома, саркома, лимфома, хондроматозная гамартома, мезотелиома; рака желудочно-кишечного тракта: пищевода (плоскоклеточная карцинома, гортани, аденокарцинома,

лейомиосаркома, лимфома), желудка (карцинома, лимфома, лейомиосаркома), поджелудочной железы (протоковая аденокарцинома, инсулинома, глюкагонома, гастринома, карциноидные опухоли, випома), тонкой кишки или тонкого кишечника (аденокарцинома, лимфома, карциноидные опухоли, саркома Капоши, лейомиома, гемангиома, липома, нейрофиброма, фиброма), толстой кишки или толстого кишечника (аденокарцинома, тубулярная аденома, ворсинчатая аденома, гамартома, лейомиома), рака толстой кишки, толстой кишки и прямой кишки, колоректального рака, рака прямой кишки; мочеполовых путей: рака почек (аденокарцинома, опухоль Вильмса [нефробластома], лимфома), мочевого пузыря и мочевыводящего канала (плоскоклеточная карцинома, переходная клеточная карцинома, аденокарцинома), предстательной железы (аденокарцинома, саркома), яичек (семинома, тератома, эмбриональная карцинома, тератокарцинома, хориокарцинома, саркома, интерстициальная клеточная карцинома, фиброма, фиброаденома, аденоматоидные опухоли, липома); печени: гепатома (гепатоцеллюлярная карцинома), холангиокарцинома, гепатобластома, ангиосаркома, гепатоцеллюлярная аденома, гемангиома, желчных путей; рака костей: остеогенная саркома (остеосаркома), фибросаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, хондросаркома, саркома Эвинга, злокачественная лимфома (ретикулярная клеточная саркома), множественная миелома, злокачественная гигантоклеточная хордома, остеохронфома (костно-хрящевые шипы), доброкачественная хондрома, хондробластома, хондромиксофиброма, остеоидная остеома и гигантоклеточные опухоли; нервной системы: черепа (остеома, гемангиома, гранулема, ксантома, деформирующий остеомиелит), мозговых оболочек (менингиома, менингиосаркома, глиоматоз), головного мозга (астроциты, медуллобластома, глиома, эпендимома, герминома [пинеалома], мультиформатная глиобластома, олигодендроглиома, шваннома, ретинобластома, врожденные опухоли), нейрофиброма спинного мозга, менингиома, глиома, саркома); гинекологического рака: матки (эндометриальная карцинома), шейки матки (цервикальная карцинома, предопухолевая цервикальная дисплазия), яичников (овариальная карцинома [серозная цистаденокарцинома, муцинозная цистаденокарцинома, неклассифицированная карцинома], гранулезотеклеточные опухоли, клеточные опухоли Сертоли-Лейдига, дисгерминома, злокачественная тератома), рака вульвы (плоскоклеточная карцинома, интраэпителиальная карцинома, аденокарцинома, фибросаркома, меланома), влагалища (светлоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, ботриоидная саркома (эмбриональная рабдомиосаркома), маточных труб (карцинома), молочной железы; рака кожи: злокачественная меланома, базальноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, саркома Капоши, кератоакантома, родимые пятна атипичного невуса, липома, ангиома, дерматофиброма, келоиды, псориаз; щитовидной железы: папиллярная карцинома щитовидной железы, фолликулярная карцинома щитовидной железы; медуллярная карцинома щитовидной железы, множественная эндокринная неоплазия типа 2А, множественная эндокринная неоплазия типа 2В, семейный медуллярный рак щитовидной железы, феохромоциты, параганглиома; и рака надпочечников: нейробластома.

[00137] В другом варианте осуществления рак выбран из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы, рака желчевыводящих путей, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака прямой кишки, глиобластомы, рака пищевода, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы или рака яичников. В других вариантах осуществления рак выбран из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и трижды отрицательного

рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, серозного рака яичников и трижды отрицательного рака молочной железы.

5 [00138] В другом варианте осуществления предоставлен способ лечения рака молочной железы при использовании ATR/Chk1 комбинированной терапии, описанной в данном описании, в комбинации с платинирующим средством. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы. В других вариантах осуществления платинирующим средством является цисплатин.

10 [00139] В другом варианте осуществления предоставлен способ лечения немелкоклеточного рака легких при использовании ATR/Chk1 комбинированной терапии, описанной в данном описании, в комбинации с цисплатином и гемцитабином. В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легких представляет собой плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах
15 осуществления соединением является соединение формулы I. В других вариантах осуществления соединением является VE-822.

[00140] Еще в другом варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой гемцитабин или цисплатин, и рак представляет собой
20 плоскоклеточный подтип немелкоклеточного рака легких. В другом варианте осуществления предоставлен способ лечения мелкоклеточного рака легких при использовании ATR/Chk1 комбинированной терапии, описанной в данном описании, в комбинации с цисплатином и этопозидом.

[00141] Другой аспект настоящего изобретения предоставляет способ стимуляции
25 клеточной смерти раковых клеток, включающий введение соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу; и введение соединения, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки имеют дефекты в каскаде передачи сигнала ATM. В другом варианте осуществления дефектом является изменение экспрессии или активности одного или более из следующего: ATM, p53, CHK2, MRE11, RAD50, NBS1, 53BP1, MDC1, H2AX, MCPH1/BRIT1, STP или SMC1. В
30 еще других аспектах дефектом является изменение экспрессии или активности одного или более из следующего: ATM, p53, CHK2, MRE11, RAD50, NBS1, 53BP1, MDC1 или H2AX.

[00142] В некоторых вариантах осуществления раковая клетка экспрессирована повреждающими ДНК онкогенами.

35 [00143] В других вариантах осуществления раковые клетки имеют измененную экспрессию или активность одного или более из следующего: K-Ras, N-Ras, H-Ras, Raf, Mus, Mos, E2F, Cdc25A, CDC4, CDK2, Cyclin E, Cyclin A и Rb.

[00144] В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способ лечения или
40 снижения тяжести заболевания, состояния или расстройства при помощи комбинированной терапии, которая ингибирует ферментативную активность путем связывания данного соединения с ATR киназой и связывания отдельного соединения с Chk1 киназой.

[00145] Другой аспект настоящего изобретения предоставляет способ лечения,
45 профилактики или снижения тяжести пролиферативных или гиперпролиферативных заболеваний у пациента, включающий введение эффективного количества первого соединения, полезного для ингибирования ATR киназы, или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей это первое соединение; и введение эффективного количества второго соединения, полезного для ингибирования Chk1 киназы, или

фармацевтически приемлемой композиции, содержащей это второе соединение. Термин "пациент", как используется в данном описании, означает животное, предпочтительно человека.

5 [00146] В некоторых вариантах осуществления "эффективное количество" соединения или фармацевтически приемлемой композиции означает такое количество, которое эффективно в случае лечения указанного заболевания. Соединения и композиции, согласно способу настоящего изобретения, могут быть введены при использовании любого количества и любого пути введения, эффективных для лечения или снижения тяжести указанного заболевания.

10 [00147] В некоторых вариантах осуществления соединение, полезное для ингибирования ATR киназы, представляет собой соединение формулы I. В других вариантах осуществления соединение, полезное для ингибирования ATR киназы, представляет собой VE-821. В других вариантах осуществления соединение, полезное для ингибирования ATR киназы, представляет собой VE-822.

15 [00148] При этом, в другом варианте осуществления предоставлен способ предотвращения клеточной репарации в раковых клетках с поврежденной ДНК, включающий введение пациенту первого соединения, полезного в качестве ингибитора ATR киназы, или композиции, содержащей это первое соединение; и введение пациенту второго соединения, полезного в качестве ингибитора Chk1 киназы, или композиции, содержащей это второе соединение.

20 [00149] В другом варианте осуществления предоставлен способ повышения чувствительности клеток по отношению к повреждающим ДНК средствам, включающий введение пациенту первого соединения, полезного в качестве ингибитора ATR киназы, или композиции, содержащей это первое соединение; и введение пациенту второго соединения, полезного в качестве ингибитора Chk1 киназы, или композиции, содержащей это второе соединение.

[00150] В соответствии с другим вариантом осуществления, ATR/Chk1 комбинированную терапию применяют в отношении рака, раковых клеток или клеток, которые обладают дефектом в белке, вовлеченном в эксцизионную репарацию оснований ("эксцизионная репарация оснований белка"). Существует множество способов, известных данной области техники, для определения, имеется ли в опухоли дефект эксцизионной репарации оснований. Например, секвенирование продуктов геномной ДНК или мРНК для каждой эксцизионной репарации оснований гена (например, UNG, PARP1 или LIG1) может быть выполнено на образце опухоли для установления того, присутствуют ли мутации при ожидаемой модуляции функционирования или экспрессии генного продукта (Wang et al., Cancer Research 52:4824 (1992)). В дополнение к мутационной инактивации, опухоль клеток может модулировать ген репарации ДНК путем гиперметилирования его промоторной области, приводя к сокращению экспрессии гена. Это наиболее часто оценивается при использовании метилирования специфической полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для количественного определения уровней метилирования представляющих интерес промоторов эксцизионной репарации оснований гена. Анализ промоторов метилирования эксцизионной репарации оснований гена коммерчески доступен (http://www.sabiosciences.com/dna_methylation_product/HTML/MEAN-421A.html).

45 [00151] Наконец, экспрессию уровней эксцизионной репарации оснований гена можно оценить по непосредственно количественной оценке уровней мРНК и белковых продуктов каждого гена при использовании стандартных технологий, таких как количественная обратная транскриптаза в сочетании с полимеразной цепной реакцией

(RT-PCR) и иммуногистохимическое исследование (ИНС), соответственно (Shinmura et al., Carcinogenesis 25: 2311 (2004); Shinmura et al., Journal of Pathology 225:414 (2011)).

[00152] В некоторых вариантах осуществления эксцизионной репарацией оснований белка являются UNG, SMUG1, MBD4, TDG, OGG1, MYH, NTH1, MPG, NEIL1, NEIL2, NEIL3 (ДНК гликозилазы); APE1, APEX2 (AP эндонуклеазы); LIG1, LIG3 (ДНК лигазы I и III); XRCC1 (LIG3 добавочная); PNK, PNKP (полинуклеотидная киназа и фосфатаза); PARP1, PARP2 (поли(ADP-рибоза)полимераза); PolB, PolG (полимераза); FEN1 (эндонуклеаза) или апраксин.

[00153] В некоторых вариантах осуществления эксцизионная репарация оснований белка представляет собой PARP1, PARP2 или PolB. В других вариантах осуществления эксцизионной репарацией оснований белка является PARP1 или PARP2.

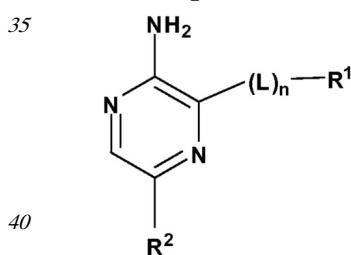
[00154] Способы, описанные выше (секвенирование гена, метилирование промотора и экспрессия мРНК) также могут быть использованы для характеристики статуса (например, экспрессии или мутации) других генов или представляющих интерес белков подобно повреждающим ДНК онкогенам, экспрессируемым опухолью, или дефектам в каскаде клеточной передачи сигнала АТМ.

Изготовление лекарственных препаратов

[00155] В другом варианте осуществления предоставлено применение соединений или композиций, описанных в данном описании, для производства лекарственных препаратов для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления соединение или композицию комбинируют с дополнительным терапевтическим средством, таким как повреждающее ДНК средство, описанное в данном описании. В другом варианте осуществления рак имеет дефект на указанном пути, описанный в данном описании.

[00156] В некоторых вариантах осуществления предоставлено применение первого соединения для ингибирования АТМ киназы в комбинации со вторым соединением для ингибирования Chk1 киназы при изготовлении лекарственного препарата для лечения рака у пациента. В другом варианте осуществления первое соединение и второе соединение комбинируют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, выбранными из агентов, перечисленных в разделе "Дополнительные терапевтические средства" настоящего описания. Еще в другом варианте осуществления рак выбран из типов рака, перечисленных в разделе "Терапевтическое применение" настоящего описания.

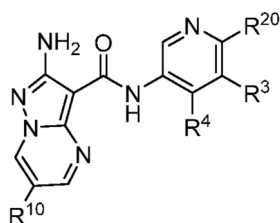
[00157] В других вариантах осуществления соединение для ингибирования АТМ киназы представлено формулой I:



I

или его фармацевтически приемлемой солью, где значения переменных являются такими, как указано в разделе "Соединения" описания настоящего описания. Кроме того, другая формула I соединения, полезного для ингибирования АТМ киназы, также описана в разделе "Соединения" настоящего описания.

[00158] Еще в других вариантах осуществления соединение для ингибирования АТМ киназы представлено формулой II:



II

или его фармацевтически приемлемой солью, где значения переменных являются такими, как указано в разделе "Соединения" настоящего описания. Кроме того, другая формула II соединения, полезного для ингибирования ATR киназы, также описана в разделе "Соединения" настоящего описания.

[00159] В других вариантах осуществления предоставлено применение первого соединения для ингибирования ATR киназы в комбинации со вторым соединением для ингибирования Chk1 киназы при изготовлении лекарственного препарата для прототирования смерти раковых клеток.

Аббревиатуры

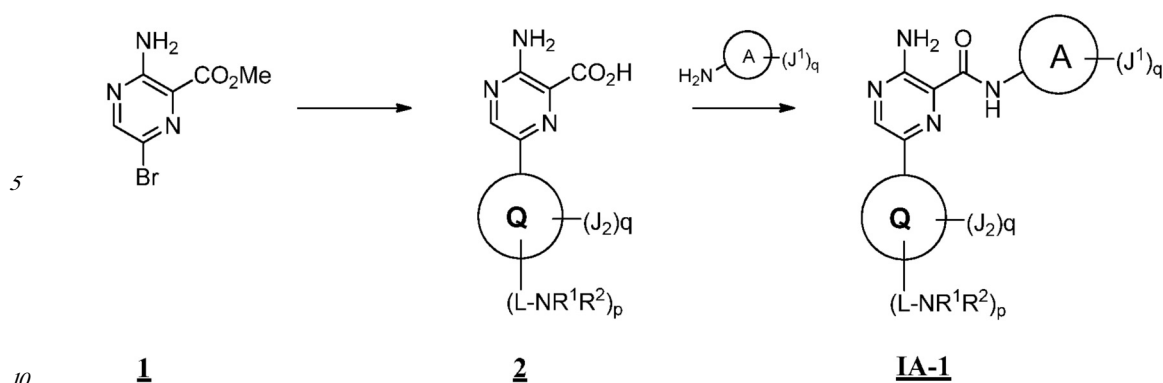
[00160] Использовали следующие аббревиатуры:

ДМСО	диметилсульфоксид
АТФ	аденозинтрифосфат
¹ Н ЯМР	протонный ядерно-магнитный резонанс
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ЖХМС	жидкостная хроматография-масс-спектрометрия
ТСХ	тонкослойная хроматография
Rt	время удерживания
НАТУ	гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метилен]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-в]пиридиний-3-оксида
ТВТУ	тетрафторборат 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуруния
ТЗР	пропилфосфониевый ангидрид
СОМУ	гексафторфосфат 1-[(1-(циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси)диметиламиноморфолино)]уруния
ТСТУ	тетрафторборат [(6-хлорбензотриазол-1-ил)окси(диметиламино)метилен]диметиламмония
НВТУ	гексафторфосфат О-бензотриазол-N,N,N',N'-тетраметилуруния
ДМФА	диметилформамид
PTSA	п-толуолсульфоновая кислота
DIPEA	N,N-диизопропилэтиламин
DCM	дихлорметан
NMP	N-метил-2-пирролидон
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид

Схемы и примеры

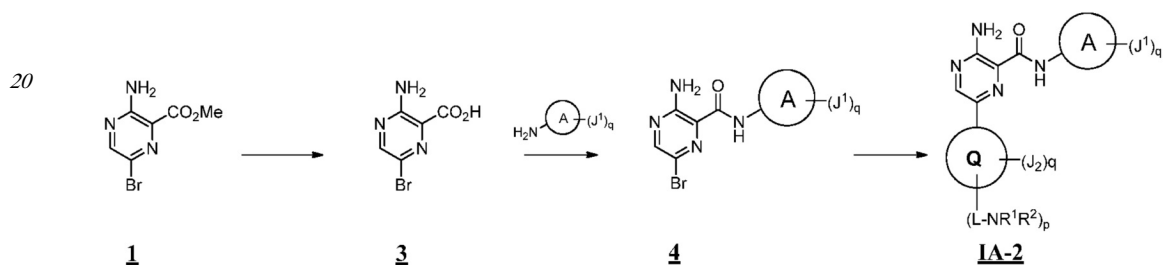
[00161] Настоящие соединения могут быть получены согласно схемам и примерам, описанным в WO 2010/071837 и WO 2014089379, содержания которых включены в настоящее описание посредством ссылки. Данные соединения могут быть проанализированы известными методами, включая но, не ограничиваясь ими, ЖХМС (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия) и ЯМР (ядерно-магнитный резонанс). Следующие общие схемы иллюстрируют методику получения соединений настоящего изобретения. Любые примеры представлены только с целью иллюстрации и ни коем образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Спектры ¹Н-ЯМР записывали при 400 МГц при использовании прибора Bruker DPX 400. Образцы для масс-спектрометрии анализировали на микромасс-спектрометре MicroMass Quattro, оборудованном в одиночном режиме МС ионизатором с электрораспылением.

Схема I-A1: Получение соединений, где -L-R¹ представляет собой ароматический амид



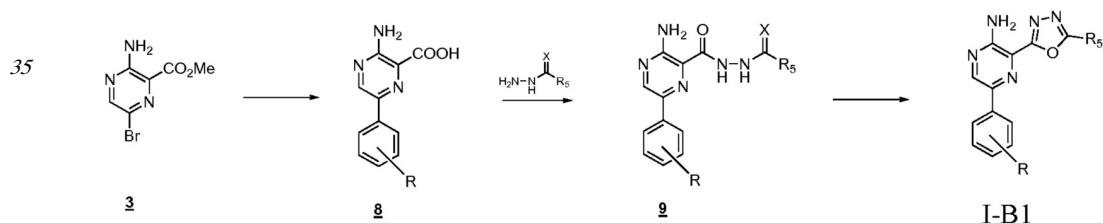
[00162] Циклические амиды соединения настоящего изобретения, где $-L-R^1$ представляет собой ароматический амид, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-A1: Коммерчески доступный сложный эфир **1** подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, с получением промежуточного соединения **2**. Группу карбоновой кислоты подвергают реакции сочетания с амином, что приводит к циклическому амиду соединения формулы IA-1.

Схема I-A2: Получение соединений, где $-L-R^1$ представляет собой ароматический амид



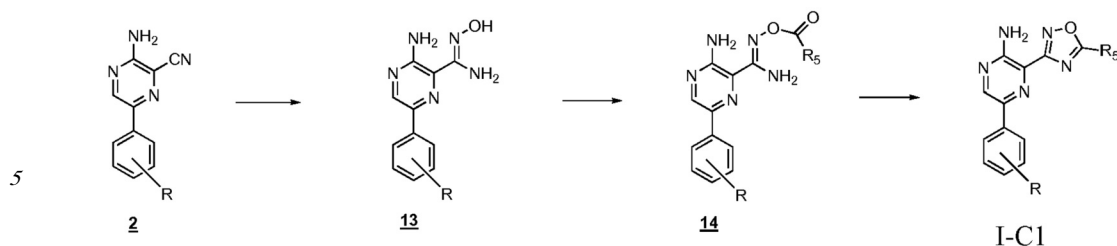
[00163] Альтернативно, соединения настоящего изобретения, где $-L-R^1$ представляет собой ароматический амид, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-A2, вариант последовательного синтеза, изображенного на схеме I-A1, который начинается с исходного сложного метилового эфира **1**. Сложный эфир **1** преобразовывают в карбоновую кислоту **3**, которую подвергают реакции сочетания с амином, с получением амида **4**. Его подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, что приводит к соединению формулы IA-2.

Схема I-B1: получение соединений, где кольцо А представляет собой 1,3,4-оксадиазол



где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

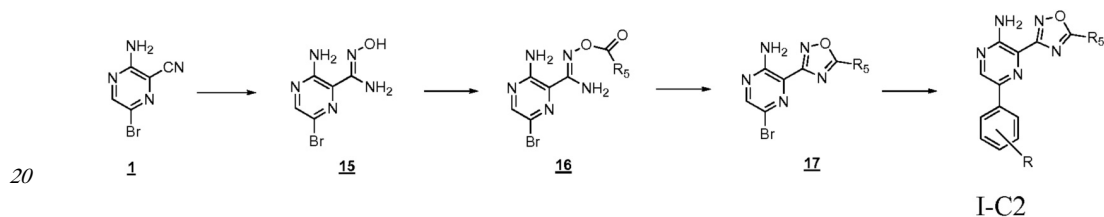
[00164] Соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой 1,3,4-оксадиазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-B1: сложный метиловый эфир **3** подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, с получением промежуточного соединения **8**. Карбоновую кислоту **8** затем подвергают реакции сочетания с гидразидом ($X=O$) или тиогидразидом ($X=S$), с образованием соединения **9**. Наконец, ацилгидразид **9** подвергают циклодегидратации, что приводит к соединению настоящего изобретения (формула I на схеме I-B1). Преобразование промежуточного продукта **8** в соединение формулы



где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00167] Соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой 1,2,4-оксадиазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-C1: нитрил **2** подвергают взаимодействию с гидроксиламином, с получением промежуточного соединения **13**. Гидроксигруппу в соединении **13** подвергают взаимодействию с хлорангидридом, что приводит к промежуточному соединению **14**, которое подвергают циклодегидратации с получением соединения формулы I-C1.

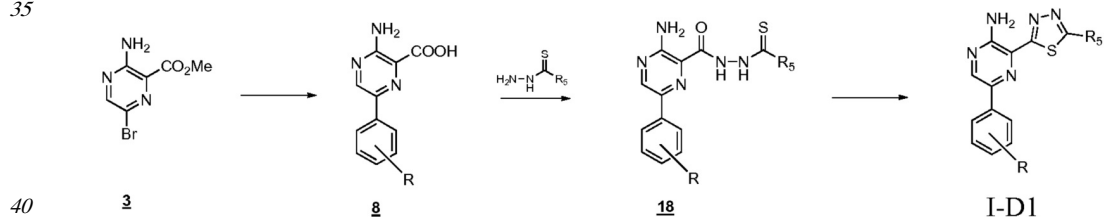
15 **Схема I-C2: получение соединений, где кольцо А представляет собой 1,2,4-оксадиазол**



где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00168] Альтернативно, соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой 1,2,4-оксадиазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-C2: Коммерчески доступный нитрил **1** подвергают взаимодействию с гидроксиламином, с получением промежуточного соединения **15**. Гидроксигруппу в соединении **15** подвергают взаимодействию с хлорангидридом, что приводит к промежуточному соединению **16**, которое подвергают циклодегидратации, с получением промежуточного соединения **17**. Содержащийся в соединении **17** бром затем используют в проведении реакции Судзуки в сочетании с бороновой кислотой, что дает соединение формулы I-C2. Когда R группа в формуле I-C2 содержит кислотный карбоксильный остаток, ее можно дополнительно подвергнуть преобразованию (например, в амид) с использованием условий, известных в данной области техники.

35 **Схема I-D1: получение соединений, где кольцо А представляет собой 1,3,4-тиадиазол**

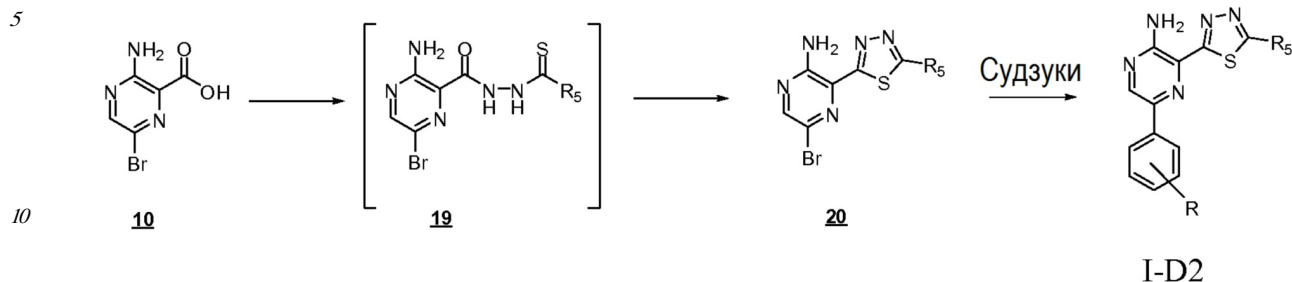


где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00169] Соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой 1,3,4-тиадиазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-D1: сложный метиловый эфир **3** подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, с получением промежуточного соединения **8**. Карбоновую кислоту **8** затем подвергают реакции сочетания с тиогидразидом, с образованием соединения **18**. Наконец, тиоацилгидразид в соединении **18** подвергают циклодегидратации, что приводит к соединению формулы I-D1. Преобразование

промежуточного продукта **8** в соединение формулы **I-D1** может быть проведено по методике одного реакционного сосуда с использованием реагентов, предназначенных для двух целей (сочетание и циклодегидратация).

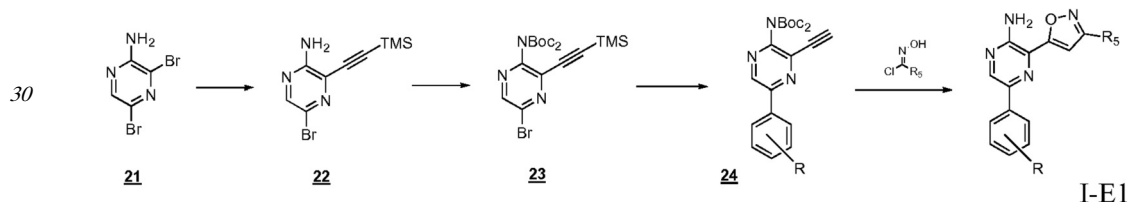
Схема I-D2: получение соединений, где кольцо А представляет собой 1,3,4-тиадиазол



где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00170] Альтернативно, соединения настоящего изобретения, где кольцо А
 15 представляет собой 1,3,4-тиадиазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-D2: кислотную функциональную группу в соединении **10** подвергают сочетанию с подходящим агентом ($R_5CSNHNH_2$), с образованием промежуточного тиацилгидразида **19**. Последующая циклодегидратация приводит к соединению **20**, в котором сформировано 1,3,4-тиадиазольное кольцо.
 20 Преобразование исходного соединения **10** в соединение **20** проводят по методике одного реакционного сосуда с использованием реагентов, предназначенных для двух целей (сочетание и циклодегидратация). Содержащийся в тиadiaзоле бром соединения **20** затем подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, что дает соединение формулы **I-D2**. Когда R группа в формуле **I-D2** содержит кислотный
 25 карбоксильный остаток, его можно дополнительно подвергнуть преобразованию (например, в амид) с использованием условий, известных в данной области техники.

Схема I-E1: получение соединений, где кольцо А представляет собой изоксазол

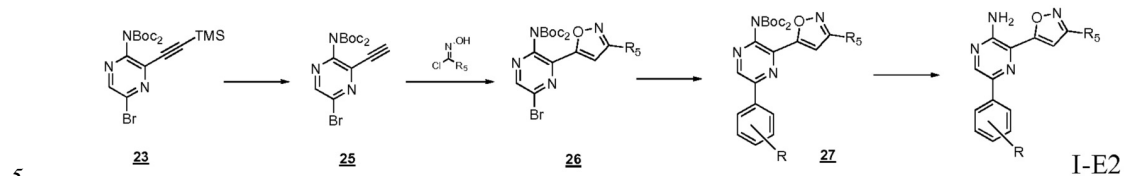


где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00171] Соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой
 35 изоксазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-E1: Коммерчески доступный 2-амино-3,5-дибромпиразин **21** подвергают сочетанию Соногашира с TMS-ацетиленом, с получением промежуточного соединения **22**, аминогруппа которого может быть полностью защищена в виде диВос соединения **23**. Сочетание Судзуки с оставшимся бромзаместителем, с сопутствующим удалением
 40 TMS защитой группы, приводит к промежуточному соединению **24**. Алкин **24**, наконец, подвергают реакции циклоконденсации с N-гидроксиарилхлоридом до конечного соединения формулы **I-E1**.

Схема I-E2: получение соединений, где кольцо А представляет собой изоксазол

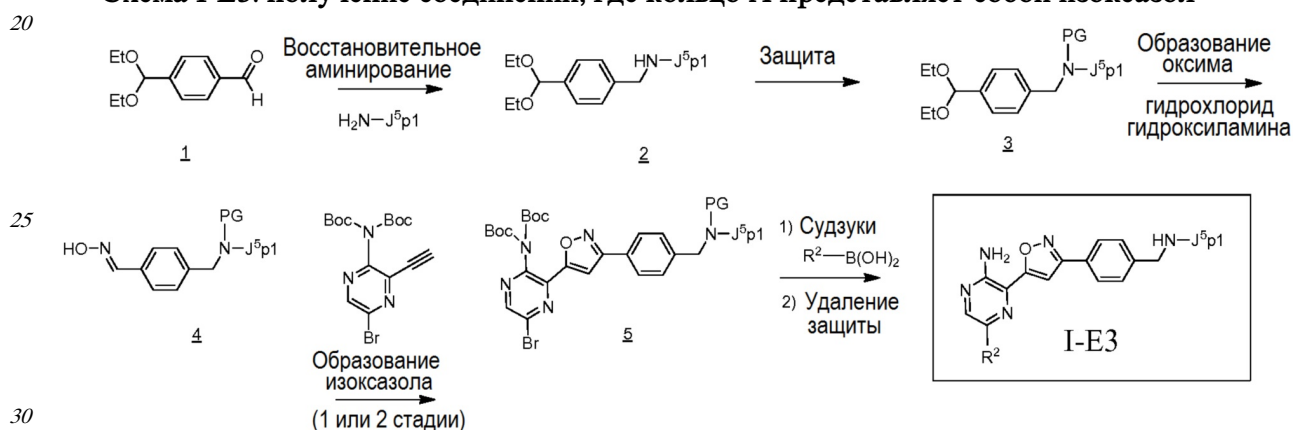
45



где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00172] Альтернативно, соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой изоксазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-E2: TMS-защищенное промежуточное соединение 23, приведенное на схеме I-E1, может быть подвергнуто удалению защиты для раскрытия алкина соединения 25. Алкин 25 подвергают реакции циклоконденсации с N-гидроксиароилхлоридом до конечного промежуточного соединения 26, в котором сформировано изоксазольное кольцо. Бромзаместитель в изоксазоле 26 затем подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, что дает соединение 27. Конечное удаление N-защитной группы в соединении 27 может раскрыть соединение формулы I. Когда R группа в формуле I-E2 содержит кислотный карбоксильный остаток, его можно дополнительно подвергнуть преобразованию (например, в амид) с использованием условий, известных в данной области техники.

Схема I-E3: получение соединений, где кольцо А представляет собой изоксазол



[00173] Соединения формулы I-E3 можно получить согласно стадиям, отображенным на схеме I-E3. Восстановительное аминирование между соединением 1 и амином (например, $J^{5p1}-NH_2$), приводит к соединению 2. Условия для восстановительного аминирования включают, например, объединение соединения 1 с $J^{5p1}-NH_2$ в метаноле, с образованием иминного промежуточного соединения, которое подвергают восстановлению с $NaBH_4$, с образованием соединения 2. Соединение 2 можно затем защитить при помощи азотзащитных групп, известных специалисту в данной области техники. Например, соединение 2 можно объединить с $(Boc)_2O$ и Et_3N в DCM, с образованием соединения 3 (где PG представляет собой Boc).

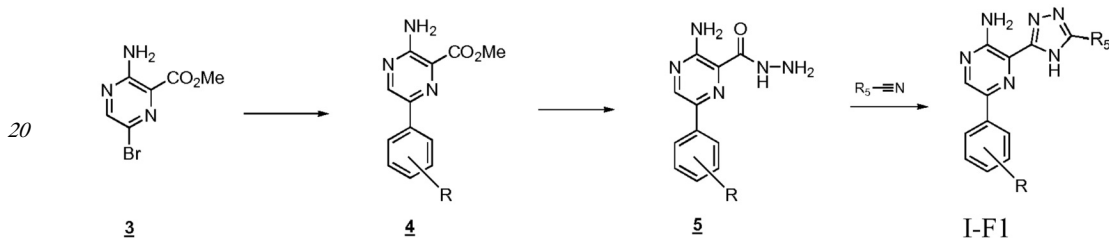
[00174] Соединение 3 можно объединить с гидрохлоридом гидроксилamina в подходящих для образования оксима условиях, с образованием соединения 4. Подходящие для образования оксима условия включают методику в одну стадию или двухстадийную методику. Методика в одну стадию включает перемешивание 1 эквивалента соединения 3 с 1,1 эквивалента $NH_2OH.HCl$ в смеси 10:1 об./об. ТГФ/вода. Двухстадийная методика включает сначала удаление защитной кетальной группы соединения 3 в условиях, подходящих для удаления альдегидной защитной группы, и

последующее формирование оксима в условиях, подходящих для двухстадийного формирования оксима, с образованием соединения 4.

[00175] Соединение 4 можно объединить с ВОС-защищенным аминопиразином, как показано на схеме I-E3, в условиях, подходящих для формирования изоксазола, с образованием соединения 5. Соединение 4 преобразовывают и подвергают [3+2] циклоприсоединению, с образованием изоксазола 5. Это преобразование можно проводить в одном сосуде, но требует две отдельные стадии. Первая стадия представляет собой окисление функциональной группы оксима в нитрон или подобное промежуточное соединение с такой же степенью окисления, например, хлороксим. Эти реакционноспособные типы веществ затем подвергают реакции [3+2] циклоприсоединения с алкином, с образованием изоксазольного аддукта.

[00176] Наконец, соединение 5 подвергают реакции сочетания при помощи металла, с образованием соединения 6. Например, соединение 5 можно объединить с бороновой кислотой в условиях кросс-сочетания Судзуки, с образованием соединения формулы 6.

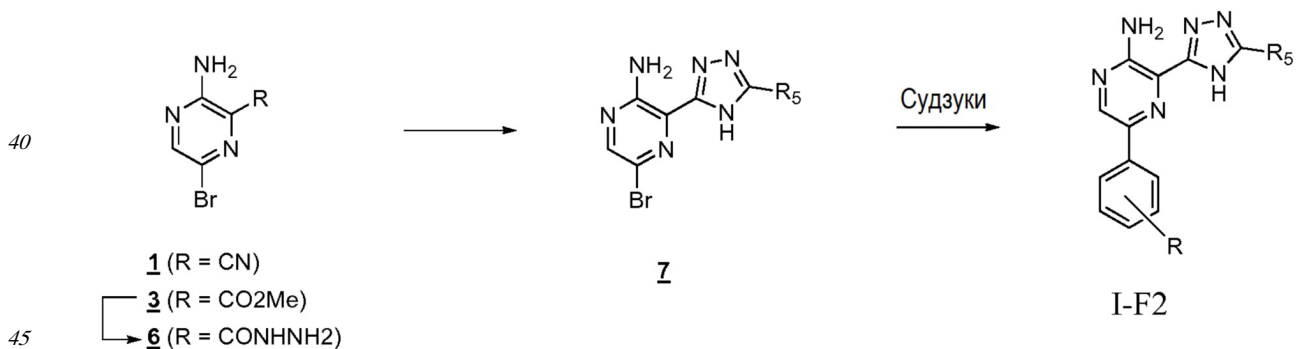
Схема I-F1: получение соединений, где кольцо А представляет собой 1,2,4-триазол



где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00177] Альтернативно, соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой 1,2,4-триазол, могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-F1, исходя из сложного метилового эфира 3. Сложный эфир 3 подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, с получением промежуточного соединения 4. Когда R группа содержит кислотный карбоксильный остаток, его можно дополнительно подвергнуть преобразованию на этой же стадии (например, в амид) с использованием условий, известных в данной области техники. Сложную метилэфирную группу в соединении 4 затем преобразовывают в гидразид путем взаимодействия с гидразином, что дает соединение 5. Наконец, гидразидную группу в соединении 5 подвергают реакции сочетания с нитрилом и затем подвергают циклодегидратации, что приводит к соединению формулы I-F1.

Схема I-F2: получение соединений, где кольцо А представляет собой 1,2,4-триазол

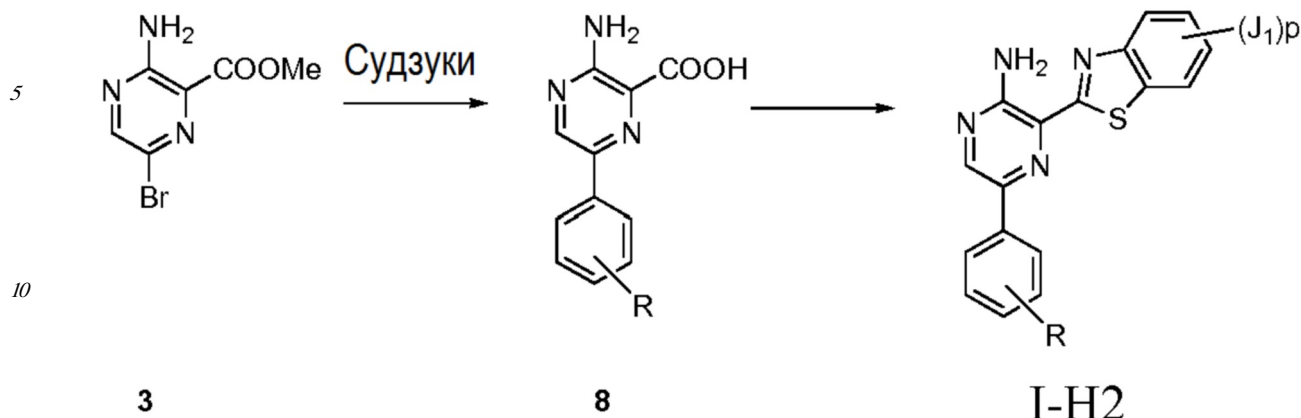


где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00178] Альтернативно, соединения настоящего изобретения, где кольцо А представляет собой 1,2,4-триазол, могут быть получены согласно способам, аналогично

соединение формулы I-II.

Схема I-H2: получение соединений, где кольцо А представляет собой бензотиазол

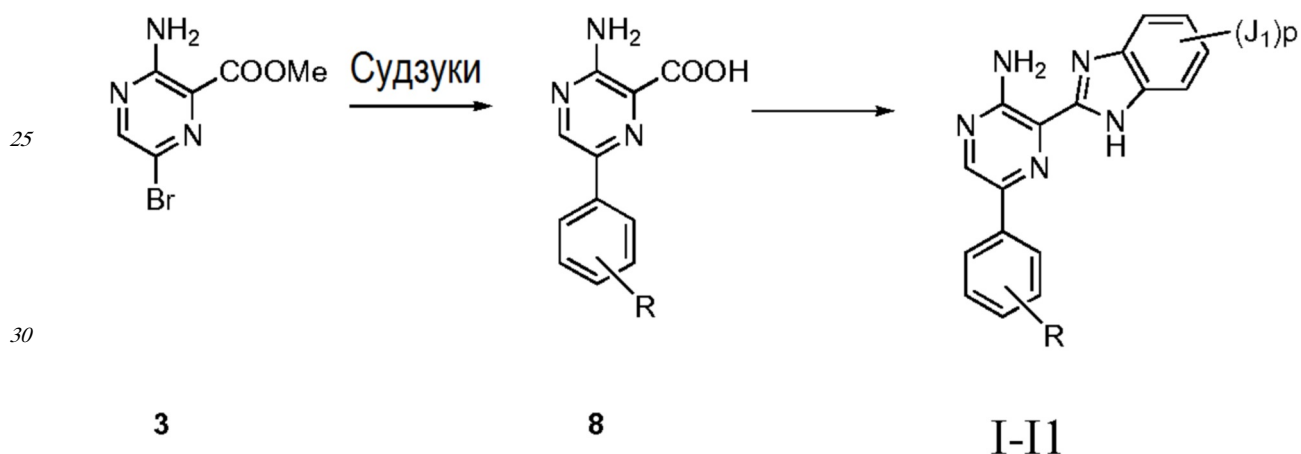


15 где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00181] Альтернативно, бензотиазольные соединения формулы VI могут быть получены согласно схеме I-H2; сложный метиловый эфир 3 подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, с получением промежуточного соединения 8. Циклизация промежуточного соединения 8 с аминобензолтиолом приводит к соединению формулы I-H2.

20

Схема I-II: получение соединений, где кольцо А представляет собой имидазол



35 где R представляет собой $-(L-NR^1R^2)_p$ или $-(J_2)_q$

[00182] Бензимидазольные соединения формулы I могут быть получены согласно способам, аналогично изображенным на схеме I-II: сложный метиловый эфир 3 подвергают взаимодействию с бороновой кислотой в условиях Судзуки, с получением промежуточного соединения 8. Циклизация промежуточного соединения 8 с бензол-1,2-диамином приводит к соединению формулы I-II.

40

Схема I-I2: получение соединений, где кольцо А представляет собой имидазол

45

диаминопиразола 30. Данную реакцию осуществляют в основных условиях (например, в присутствии ацетата калия или AcONa) при нагревании (например, 110°C) для обеспечения полной циклизации.

5 [00187] Промежуточное соединение 30 можно дополнительно конденсировать с диэлектрофильным агентом сочетания, с образованием пиримидина 31. На стадии образования пиримидина промежуточное соединение 30 подвергают взаимодействию с 1,3-диэлектрофильным агентом (например, 1,3-диальдегидом или 3-(диалкиламино) проп-2-еналем) в различных типах растворителей (например, ДМФА или смеси ДМСО/ вода) до окончательного образования бициклического ядра соединения 31. Когда один 10 или два электрофильных центра защищены/замаскированы (например, замаскированный альдегид в виде кетала), требуется введение сульфоновой кислоты (например, PTSA) для разблокировки реакционноспособных функциональных групп.

[00188] Удаление защитной группы, например, посредством гидролиза аллилового сложного эфира, приводит к карбоновым кислотам 32. На стадии удаления защиты 15 соединения 31 подвергают воздействию гидролитических условий, которые известны специалисту в данной области техники. Например, обработка соединения 31 фенилсиланом или 4-метилбензолсульфинатом в присутствии каталитического количества палладия (например, Pd(PPh₃)₄) приводит к образованию соответствующей карбоновой кислоты 32. Альтернативно, соединение 31 может быть обработано водной 20 щелочью (например, NaOH, LiOH или KOH), с получением кислот 32.

[00189] На стадии образования активированного сложного эфира карбоновые кислоты 32 подвергают взаимодействию с амидными агентами сочетания, известными 25 специалисту в данной области техники. Подходящие амидные агенты сочетания включают, но, не ограничиваясь ими, TBTU, TCTU, NATU, T3P и COMU. Когда агент сочетания признан подходящим, данные взаимодействия могут протекать быстро (~1 час) при комнатной температуре в присутствии органического основания (например, триэтиламина, DIPEA), с получением активированных сложных эфиров 33. Например, когда используют амидный агент сочетания TBTU [J=N] или TCTU [J=Cl], соединения 33 быстро получают фильтрованием реакционной смеси.

30 [00190] Образование активированных сложных эфиров 33 перед формированием амидной связи для получения соединения II, как правило, более предпочтительно, хотя прямое преобразование соединения 32 в соединение формулы II настоящего изобретения также возможно. Альтернативные активированные сложные эфиры также могут быть использованы (выделенные или образованные *in situ*) и известны специалисту в данной 35 области техники (например, использование агентов сочетания TBTU, TCTU, NATU, T3P, COMU).

[00191] На стадии образования амидной связи активированные сложные эфиры 33 могут быть подвергнуты взаимодействию с замещенным 3-аминопиридином, с 40 получением соединения формулы II настоящего изобретения. Реакционными условиями для сочетания амидов, как правило, являются апротонный растворитель (например, NMP, пиридин, ДМФА и т.д.) и нагревание (например, ≥90°C). 3-Аминопиридин может быть дополнительно функционализирован с последующим формированием амидной связи.

45 [00192] Альтернативно, две стадии, описанные выше, можно объединить: карбоновые кислоты 32 можно использовать в качестве исходной точки для формирования амидной связи, активированные сложные эфиры генерировать *in situ*, используя такие же агенты сочетания амидов, как описано выше. Соединения II настоящего изобретения выделяют по одному из методов, описанных выше.

обеспечения Columbus. Интенсивность ≥ 2000 AU рассматривали как пан-ядерные γ H2AX положительные клетки. Данные представлены в виде среднего \pm S.E.M.

[00197] Обработка U2OS раковых клеток либо ингибитором ATR VE-821 или ингибитором Chk1 AZD7762 сама по себе оказывает минимальное воздействие на процент положительных клеток пан-ядерного γ H2AX (<5% клеток были положительными для пан-ядерного γ H2AX). В противоположность этому, обработка обоими агентами приводила к >20% положительно окрашенным клеткам для пан-ядерного γ H2AX. Это согласуется с увеличением повреждения ДНК. Эти данные подтверждают, что комбинация ингибиторов Chk1 и ингибиторов ATR может приводить к повреждению ДНК в раковых клетках.

Пример 2а: Ингибирование Chk1 или экспрессия неактивных мутантных форм Chk1 восприимчивых раковых клеток к ингибированию ATR

[00198] Как показано на фиг.2а и 2b, влияние ингибирования Chk1 или экспрессии неактивного мутанта Chk1 на клеточный ответ, вызванный ингибитором ATR VE-821, оценивали при использовании анализа на выживание по способности к колониеобразованию в различных раковых клетках. 500 клетками U2OS, MCF-7, DLD-1, DLD-1 Chk1^{S317A/-}, DLD-1 Chk1^{+/-}, DLD-1 ATR^{S/S} и 1000 клетками VH-10 покрывали 10 см пластину. После 5 часов инкубации (5% CO₂ при 37°C), добавляли различные концентрации в наполнителе (0,05% ДМСО max) ингибитора ATR VE-821 непосредственно в среду, содержащуюся на пластине, и инкубировали в течение 72 часов. По окончании 72 часовой инкубации, среду, содержащую наполнитель и лекарственное средство, заменяли свежей средой, и продолжали инкубировать в течение следующих 5-8 дней перед фиксацией пластин и окрашиванием 4% метиленовым голубым в MeOH, и колонии подсчитывали вручную. Каждая точка данных представляет собой среднее \pm SEM в трех повторах.

[00199] Ингибирование Chk1 посредством AZD7762 (20 нМ) приводит в результате к повышенной чувствительности к ATR ингибитору VE-821 в MCF-7 и U2OS раковых клетках, но не повлияло на VH10 нераковые клетки. Например, обработка клеток MCF-7 и U2OS только 1 мкМ VE-821 (ранее показанная концентрация для 50% ингибирования активности ATR {ref NCB paper}) приводит в результате к 10-20% выживаемости по способности к колониеобразованию. Дополнительная обработка Chk1 ингибитором, AZD7762, приводит к 2% или меньшей выживаемости по способности к колониеобразованию в обеих клеточных системах. Экспрессия инактивной мутантной формы Chk1 в равной степени сенсibilizировала клетки в отношении ATR ингибитора VE-821. Родительские DLD-1 клетки не были затронуты при обработке VE-822 (~100% жизнеспособность клеток при 1 мкМ VE-821), в отличие от обработки DLD-1 клеток экспрессированной инактивной мутантной формы Chk1 (S317A/-) посредством 1 мкМ VE-821 приводила к менее чем 3% оставшихся жизнеспособных клеток. Эти данные подтверждают, что ингибирование Chk1 (или экспрессия инактивной Chk1) может увеличивать чувствительность раковых клеток к ингибированию ATR, в результате приводя к сокращению выживаемости клеток, но не нераковых клеток, которые толерантны к данной комбинации.

Пример 2b: Экспрессия сМYC онкогена повышает чувствительность клеток к комбинированному ингибированию ATR и Chk1

[00200] Ссылаясь на фиг.2с, пару линий изогенных клеток, отличающихся только экспрессией онкогена сМYC (HA1EB-GFP родительские и сМYC трансформированные клетки, HA1EB-GFP-сМYC) подвергали обработке либо только VE-821 (при концентрации до 5 мкМ), только AZD7762 (30 нМ) или комбинацией VE-821 и AZD7762

в течение 72 часов. Выживаемость клеток оценивали путем окрашивания резазурином. Ни VE-821, ни AZD7762 не оказали заметного воздействия на жизнеспособность родительской клетки. Кроме того, только AZD7762 не влияет на жизнеспособность сМУС трансформированные клетки. В отличие от этого, VE-821 снижает жизнеспособность сМУС трансформированных клеток (~40% оставшихся жизнеспособных клеток), и комбинация заметно снижает клеточную жизнеспособность сМУС трансформированных клеток (<5% оставшихся жизнеспособных клеток).

Пример 2с: Потеря функции p53 и RB и экспрессия онкогена H-RAS повышает чувствительность клеток к комбинированному ингибированию ATR и Chk1

[00201] Ссылаясь на фиг.2d, использовали две линии изогенных клеток для оценки влияния комбинации VE-821 и AZD7762 (BJ-hTERT родительские клетки или BJ-SV40T клетки экспрессирующие антиген большой опухоли, который инактивирует функцию p53 и RB) на потерю функции повышения клеточной чувствительности p53 и RB. Кроме того, влияние на экспрессию H-RAS онкогена оценивали в BJ-SV40T клетках, трансформированных с активированным H-RAS(G12V) (BJ RAS). Клетки подвергали обработке либо только VE-821 (при концентрации до 5 мкМ), только AZD7762 (30 нМ) или комбинацией VE-821 и AZD7762 в течение 72 часов. Выживаемость клеток оценивали путем окрашивания резазурином. Только AZD7762 не имел заметного влияния на жизнеспособность любой из клеточных линий. Только VE-821 снижал жизнеспособность H-RAS трансформированных клеток (~60% оставшихся жизнеспособных клеток). В отличие от этого, комбинация VE-821 и AZD7762 заметно снижала жизнеспособность как p53 и RB инактивированных клеток (~30% оставшихся жизнеспособных клеток), так и H-RAS трансформированных клеток (<10% оставшихся жизнеспособных клеток).

Пример 3: Ингибирование Chk1 опухолей, сенсibiliзированных к ATR ингибированию

[00202] Влияние ингибирования Chk1 на ответ опухоли в отношении ATR ингибитора VE-821 оценивали на двух различных ксенотрансплантатных мышинных моделях Balb/C голых мышей при использовании клеточной линии MX-1 рака молочной железы (фиг.3a и 3b) и клеточной линии H460 рака легких (фиг.4a и 4b). В случае MX-1 модели, голым мышам инъецировали 2 миллиона клеток в 50% матригеле, и в случае модели H460, голым мышам инъецировали 5 миллионов клеток в PBS. Спустя 8-9 дней после имплантации, животных распределяли на 4 группы по 5 животных с размером опухоли со средним объемом 130 мм³. 1-ую группу дозировали наполнителем (10% раствор сукцината D-α-токоферолполиэтиленгликоля 1000 (Sigma)) в воде, перорально через зонд, и 11,3% раствор (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина в нормальном физиологическом растворе путем внутрибрюшинной инъекции. 2-ая группа получала 25 мг/кг массы тела Chk1 ингибитора, AZD7762, растворенного в 11,3% растворе (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина в нормальном физиологическом растворе, путем внутрибрюшинной инъекции. 3-ая группа получала 60 мг/кг массы тела ATR ингибитора, VE-822, растворенного в 10% растворе сукцината D-α-токоферолполиэтиленгликоля 1000 в воде, перорально через зонд. 4-ая группа получала как 25 мг/кг массы тела AZD7762, растворенного в 11,3% растворе (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина в нормальном физиологическом растворе, путем внутрибрюшинной инъекции, так и 60 мг/кг массы тела VE-822, растворенного в 10% растворе сукцината D-α-токоферолполиэтиленгликоля 1000 сукцинат в воде, перорально через зонд. Массу тела и объем опухоли измеряли дважды в неделю. Объем опухоли измеряли при помощи штангенциркуля и приводили как среднее±S.E.M (длина×высота×ширина×0,52).

[00203] На модели ксенотрансплантатных мышей MX-1, обработка ATR ингибитором

VE-822 оказывает минимальное воздействие на размер опухоли (фиг.3а) или выживаемость (фиг.3б). Обработка Chk1 ингибитором, AZD7762, снижала рост опухоли, но не оказывала влияния на выживаемость. Обработка обоими агентами вместе, при сравнении с обработкой только одним агентом, приводила к ингибированию роста опухоли и статистически значимому улучшению выживаемости ($P < 0,05$). На модели ксенотрансплантатных мышей H460, обработка только ATR ингибитором VE-822 или только Chk1 ингибитором AZD7762 оказывала минимальное воздействие на размер опухоли (фиг.4а) или выживаемость (фиг.4б). В отличие от этого, комбинированная обработка обоими агентами приводит в результате к почти полному ингибированию роста опухоли и длительной выживаемости. Для роста опухоли разница между группами с комбинированной обработкой и группами с монообработкой достигла статистической значимости ($P < 0,05$). Аналогичным образом, выживаемость среди групп с комбинированной обработкой и групп с монообработкой достигла статистической значимости ($P < 0,01$). У обеих моделей с комбинированной обработкой наблюдается хорошая переносимость потери массы тела. Эти данные подтверждают, что комбинация ингибиторов Chk1 и ингибиторов ATR может обеспечить выгодную противоопухолевую активность *in vivo*.

Пример 4: Ингибирование Chk1 раковых клеток, сенсibilизированных к комбинированной обработке ATR ингибитором и иллюстративным повреждающим ДНК средством

[00204] Ссылаясь на фиг.5, влияние ингибирования Chk1 посредством AZD7762 на апоптозные клетки, по сравнению с обработанными ATR ингибитором VE-821 и иллюстративным повреждающим ДНК средством, гидроксилмочевинной (2 мМ), оценивали путем измерения уровня расщепления каспазы-3, при использовании маркера апоптоза широкого диапазона. U2OS клетки обрабатывали в течение 24 часов повреждающим ДНК средством, гидроксилмочевинной, и различными дозами AZD7762 и/или VE-821. Клетки последовательно окрашивали антирасщепляемой каспазой-3 и β -актиновыми антителами, и использовали конфокальную микроскопию для получения и количественного изучения изображений. Данные представлены в виде % положительных клеток для расщепленной каспазы-3. Обработка только гидроксимочевинной приводит к минимальной активации каспазы-3 ($< 0,5\%$ положительных клеток). Добавление либо Chk1 ингибитора, AZD7762, или ATR ингибитора VE-821 оказывает минимальное воздействие на расщепление каспазы-3 по сравнению с обработкой только гидроксилмочевинной ($< 1\%$ положительных клеток). В отличие от этого, комбинирование обоих агентов приводит к увеличению расщепления каспазы-3 ($> 4\%$ положительных клеток). Эти данные подтверждают, что комбинированная обработка ингибиторами Chk1 и ATR может увеличивать чувствительность клеток к повреждающему ДНК средству.

Пример 5: Активация ATR посредством ингибитора Chk-1 является высокой в раковых клетках, но не в нормальных клетках

[00205] Как показано на фиг.6а и 6б, U2OS раковые клетки (фиг.6а) и нормальные фибробластные клетки Vh-10 (фиг.6б) обрабатывали в течение 3 часов ДМСО, AZD7762 (300 нМ), ATR ингибитором VE-821 (20 мкМ) и их комбинациями. Клетки фиксировали в 4% PFA и окрашивали антилюминофором (серин 139) гистон H2AX антителами (первичное антитело) и Alexa 555 (вторичное антитело). Считывание более чем 9 очагов γ H2AX на клетку рассматривали как положительную клетку. Гистограммы показаны как среднее \pm S.E.M. ($n=3$). Они показывают, что Chk1 ингибирование может привести к активации ATR субстратов в раковых, но не в нераковых клетках.

[00206] В другом примере, как показано на фиг.6с и 6d, влияние ингибирования Chk1 посредством AZD-7762 и ингибирования ATR посредством VE-821 на уровни повреждения ДНК в раковых клетках вновь оценивали путем измерения накопления пан-ядерного γ H2AX, при использовании индикатора широкого диапазона уровней высокого повреждения ДНК (фиг.6с) и щелочного кометного анализа, который измеряет разрывы ДНК (фиг.6d). U2OS раковые клетки обрабатывали в течение 24 часов ДМСО, AZD-7762 (30 нМ) и/или VE-821 (10 мкМ). Для оценки γ H2AX, клетки затем окрашивали антилюминофором (серин 139) гистон H2AX антителом в качестве первичного антитела, и флуоресцентным вторичным антителом, и использовали флуоресцентный микроскоп Operetta для получения изображений, которые анализировали при использовании программного обеспечения Columbus. Клетки с девятью или более γ H2AX очагами рассматривались как γ H2AX положительные. Клетки со смазанными γ H2AX и неразличаемыми очагами рассматривались как пан-ядерный γ H2AX клеточный позитив. Для оценки разрывов ДНК кометным анализом, данные клетки подвергали электрофорезу в агарозном геле в условиях щелочной денатурации, и ДНК окрашивали красителем YOYO-1. Использовали флуоресцентный микроскоп Operetta для получения изображений, которые анализировали при использовании программного обеспечения Cometscore. Данные представлены в виде среднего \pm S.E.M.

[00207] Обработка U2OS раковых клеток только ATR ингибитором VE-821 или только Chk1 ингибитором AZD-7762, или обработка обоими агентами, оказывала минимальное воздействие на процент γ H2AX клеточного позитива за данный момент времени (24 часа). Обработка либо только VE-821 или AZD-7762 оказывала минимальное воздействие на процент клеточного позитива для пан-ядерных γ H2AX (<5% положительных клеток) или отображение моментов кометного хвоста, свидетельствующих о разрывах ДНК (<10% положительных клеток). В противоположность этому, обработка обоими агентами приводила к >50% окрашиванию положительных клеток для пан-ядерных γ H2AX (фиг.6с) и >30% отображению клеточных кометных хвостов (фиг.6d). Эти результаты указывают на то, что комбинация Chk1 ингибиторов и ингибиторов ATR может привести к увеличению повреждения ДНК в раковых клетках.

Пример 6: Комбинация ATR ингибитора и Chk-1 ингибитора индуцирует образование одноцепочечной ДНК

[00208] Как показано на фиг.7а и 7b, U2OS раковые клетки и нормальные фибробластные клетки VH-10 обрабатывали в течение 24 часов при дозах, приведенных на указанных фигурах. После обработки, клетки предварительно экстрагировали для отмывания не связанной хроматином фракции RPA и фиксировали в 4% PFA. Клетки окрашивали анти RPA 32 антителом; изображения снимали при использовании конфокального микроскопа и анализировали при использовании программного обеспечения Image J. Значения интенсивности \geq 70 AU на клетку рассматривали как клеточный позитив. Количественные данные для U2OS и VH-10, соответственно, при n=3, среднее \pm S.E.M. Это указывает на то, что ингибирование Chk1 приводит к повышенной ssДНК (маркер стресс репликации), что усиливается ингибированием ATR в раковых, но не в нераковых клетках.

Пример 7: Комбинация ATR ингибитора и Chk1 ингибитора синергетически убивает раковые клетки, но не нормальные клетки

[00209] Как показано на фиг.8а-8g, множественные линии раковых клеток (U2OS (а), H460 (с), МХ-1 (d), НСТ-116 (е), МСF7 (f) и HL60 (h) раковые клетки), а также нормальные фибробластные и эндотелиальные клетки (VH-10 (b) и HUVAC (g)), высевали в 96-

луночные планшеты и обрабатывали в течение 72 часов дозами, приведенными на указанных фигурах. Основанный на резазурине анализ использовали для измерения жизнеспособности клеток после введения VE-821 и AZD7762 либо по отдельности или в комбинации. Лекарственное взаимодействие анализировали с помощью программного обеспечения Comrusyn. CI индекс ниже 1 принимали за синергическое взаимодействие. Количественные данные при $n=3$, среднее \pm S.E.M. На данных фигурах показана жизнеспособность конкретных клеточных линий при сравнении отдельных ингибиторов или в комбинации. Вновь ссылаясь на фиг.8a-8g, сопровождающая кривая межлекарственного взаимодействия также предоставлена для каждой клеточной линии после введения как VE-821, так и AZD7762. Как показано на кривых жизнеспособности клеток, так и межлекарственного взаимодействия, комбинация ATR и Chk1 ингибиторов обладает синергической цитотоксичностью во всех раковых клеточных линиях, но не в нераковых клетках. Это дает возможность предположить, что комбинация ATR и Chk1 ингибиторов может быть использована для убийства опухолевых клеток, при этом, не затрагивая нормальную ткань.

Пример 8: Ингибирование Chk1 и ATR не приводит к высоким уровням повреждения ДНК в нормальных клетках

[00210] Как показано на фиг.9, влияние ингибирования Chk1 посредством AZD-7762 и ингибирования ATR посредством VE-821 на уровни повреждения ДНК в нормальных клетках оценивали путем измерения накопления пан-ядерного γ H2AX с использованием индикатора широкого диапазона высоких уровней повреждения ДНК, и путем измерения накопления дискретных очагов γ H2AX и 53BP1, которые являются маркерами низких уровней повреждения ДНК. Vh-10 нормальные фибробласты обрабатывали в течение 24 часов ДМСО, AZD-7762 (30 нМ или 60 нМ) и/или VE-821 (10 мкМ). Клетки затем окрашивали антилюминофором (серин 139) гистон H2AX и анти-53BP1 антителом в качестве первичных антител, и флуоресцентными вторичными антителами, и использовали флуоресцентный микроскоп Operetta для получения изображений, которые анализировали при использовании программного обеспечения Columbus. Клетки с девятью или более γ H2AX или 53BP1 очагами рассматривались как γ H2AX или 53BP1 положительные очаги. Клетки со смазанными γ H2AX и неразличаемыми очагами рассматривались как пан-ядерный γ H2AX клеточный позитив. Данные представлены в виде среднего \pm S.E.M.

[00211] Обработка Vh10 нормальных клеток либо только ATR ингибитором VE-821 или только Chk1 ингибитором AZD-7762, или обработка обоими агентами оказывает минимальное воздействие на процент окрашенных очагов γ H2AX клеточного позитива, очагов 53BP1 клеточного позитива или пан-ядерного γ H2AX клеточного позитива. Соответственно, обработка обоими агентами приводила к <2% окрашенных положительных клеток для пан-ядерного γ H2AX (фиг.5b). Эти результаты подтверждают, что комбинация Chk1 ингибиторов и ингибиторов ATR не приводит к увеличению повреждения ДНК в нормальных клетках.

Пример 9: Синергизм ATR ингибитора VE-822 с различными Chk ингибиторами

[00212] Как показано на фиг.10 a-d, HT29 раковые клетки обрабатывали в трех повторах VX-970 и указанными Chk ингибиторами в течение 96 часов, затем жизнеспособность клеток измеряли при помощи MTS анализа. Синергизм анализировали с 95% интервалом при использовании программного обеспечения MacSynergy II.

[00213] Все протестированные Chk ингибиторы продемонстрировали синергическую цитотоксичность в комбинации с ATR ингибитором VE-822, включая двойной Chk1 и Chk2 ингибитор AZD-7762 (a) и Chk1 селективный ингибитор SCH-900776 (d). Эти

результаты подтверждают, что АТР ингибитор может эффективно объединяться с различными клиническими Chk1 ингибиторами на раковых клетках.

Анализы

Пример 10: Анализ на клеточное ингибирование АТР

5 [00214] Соединения могут быть подвергнуты скринингу на их способность ингибировать внутриклеточную АТР, используя иммуофлюоресцентный микроскопический анализ для детектирования фосфорилирования АТР субстрата гистона H2AX в обработанных гидроксимочевинной клетках. HT29 клетками при 14000
10 клеток на лунку покрывали 96-луночные черные планшеты для визуализации (BD 353219) в среде Маккойя 5А (Sigma M8403), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (JRH Biosciences 12003), разведенным раствором пенициллин/стрептомицин 1:100 (Sigma P7539) и 2 мМ L-глутамином (Sigma G7513), и давали возможность прикрепления в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Затем к клеточной среде добавляли соединения при конечной концентрации 25 мкМ в 3-кратных серийных разведениях, и
15 клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Спустя 15 мин, добавляли гидроксимочевину (Sigma H8627) до конечной концентрации 2 мМ.

[00215] После 45 минутной обработки гидроксимочевинной, клетки промывали в PBS, фиксировали в течение 10 мин в 4% формальдегиде, разбавленном в PBS (Polysciences
20 Inc 18814), промывали в 0,2% Tween-20 в PBS (промывной буфер), и пермеабилizировали в течение 10 мин в 0,5% Triton X-100 в PBS, все при комнатной температуре. Клетки затем промывали один раз в промывном буфере и блокировали в течение 30 мин при комнатной температуре в 10% козьей сыворотке (Sigma G9023), разведенной в промывном буфере (блокирующий буфер). Для детекции H2AX уровней
25 фосфорилирования, клетки затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в первичном антителе (мышинное моноклональное антифосфорилированный гистон H2AX Ser139 антитело; Upstate 05-636), разведенном 1:250 в блокирующем буфере. Клетки затем промывали пять раз в промывном буфере перед инкубацией в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте в смеси вторичного антитела (козлиное
30 антимышиное Alexa Fluor 488 конъюгированное антитело; Invitrogen A11029) и красителя Хехста (Invitrogen H3570); разведенных 1:500 и 1:5000, соответственно, в промывном буфере. Клетки затем промывали пять раз в промывном буфере, и, наконец, добавляли 100 мкл PBS в каждую лунку перед получением изображения.

[00216] Клетки изображали в виде Alexa Fluor 488 и интенсивности Хехста при
35 использовании BD Pathway 855 Bioimager и программного обеспечения Attovision (BD Biosciences, Version 1.6/855) для количественной оценки фосфорилирования H2AX Ser139 и окрашивания ДНК, соответственно. Процент фосфорилированных H2AX-положительных ядер при составлении 9 изображений с 20x увеличением затем рассчитывали для каждой лунки при помощи программного обеспечения BD Image
40 Data Explorer (BD Biosciences Version 2.2.15). Фосфорилированные H2AX-положительные ядра определяли как "Хехст"-положительные области, представляющих интерес обладающих Alexa Fluor 488 интенсивностью при 1,75-кратной средней Alexa Fluor 488 интенсивности в клетках, не подвергнутых обработке гидроксимочевинной. Процент H2AX положительных ядер, наконец, наносили на график от концентрации для каждого соединения, и определяли значения IC50 для внутриклеточного АТР ингибирования с
45 использованием программного обеспечения Prism (GraphPad Prism version 3.0cx для программного обеспечения Macintosh, GraphPad, San Diego California, USA).

[00217] Соединения, описанные в данном описании, также могут быть протестированы другими методами, известными в данной области техники (см. Sarkaria et al, "Inhibition

of ATM and ATR Kinase Activities by the Radiosensitizing Agent, Caffeine: *Cancer Research* 59: 4375-5382 (1999); Hickson et al, "Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM" *Cancer Research* 64: 9152-9159 (2004); Kim et al, "Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members" *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53): 37538-37543 (1999); и Chiang et al, "Determination of the catalytic activities of mTOR и other members of the phosphoinositide-3-kinase-related kinase family" *Methods Mol. Biol.* 281:125-41 (2004)).

Пример 11: Анализ на ATR ингибирование

[00218] Соединения могут быть скринированы на их способность ингибировать ATR киназу при использовании анализа включения радиоактивных фосфатов. Данный анализ осуществляют в смеси 50 мМ Трис/HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT.

Конечные концентрации субстратов составляли 10 мкМ [γ -³³P]ATP (3mCi ³³P ATP/ммоль ATP, Perkin Elmer) и 800 мкМ целевого пептида (ASELPASQPQPFSAKKK).

[00219] Анализы осуществляли при 25°C в присутствии 5 нМ полноразмерного ATR. Маточный буферный раствор для анализа получали содержащим все указанные реагенты, перечисленные выше, за исключением ATP и представляющего интерес тестируемого соединения. 13,5 мкл маточного раствора помещали в 96-луночный планшет с последующим добавлением 2 мкл исходного ДМСО, содержащего серийные разведения тестируемого соединения (обычно начиная с конечной концентрации 15 мкМ с 3-кратными серийными разведениями) в двух повторах (конечная концентрация в ДМСО 7%). Планшет предварительно инкубировали в течение 10 минут при 25°C, и реакцию инициировали добавлением 15 мкл [γ -³³P]ATP (конечная концентрации 10 мкМ).

[00220] Реакцию останавливали спустя 24 часа добавлением 30 мкл 0,1М фосфорной кислоты, содержащей 2 мМ ATP. Многоэкранный фосфоцеллюлозный фильтр 96-луночного планшета (Millipore, Cat no. MAPHN0B50) предварительно обрабатывали 100 мкл 0,2М фосфорной кислотой перед добавлением 45 мкл останавливающей анализ смеси. Планшет промывали 5×200 мкл 0,2М фосфорной кислоты. После сушки, в лунки добавляли 100 мкл Optiphase 'SuperMix' жидкого сцинтилляционного коктейля (Perkin Elmer) перед сцинтилляционным подсчетом (1450 Microbeta Liquid Scintillation Counter, Wallac).

[00221] После удаления средних фоновых значений для всех точек данных, рассчитывали значения Ki(app) из данных нелинейного регрессионного анализа начальной скорости при использовании пакета программного обеспечения Prism (GraphPad Prism version 3.0сх для программного обеспечения Macintosh, GraphPad, San Diego California, USA).

Пример 12: Анализ на сенсбилизацию цисплатина

[00222] Соединения можно скринировать на их способность повышать чувствительность клеток НСТ116 рака прямой кишки к цисплатину используя 96 часовой анализ на жизнеспособность клеток (MTS). НСТ116 клетками, которые обладают дефектом в ATM передаче сигнала к цисплатину (см., Kim et al.; *Oncogene* 21:3864 (2002); см. также, Takemura et al.; *JBC* 281:30814 (2006)), при 470 клеток на лунку покрывали 96-луночные полистирольные планшеты (Costar 3596) в 150 мкл среды Маккойя 5А (Sigma M8403), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (JRH Biosciences 12003), разведенным раствором пенициллин/стрептомицин 1:100 (Sigma P7539), и 2 мМ L-глутамином (Sigma G7513), и давали возможность прикрепления в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Соединения и цисплатин затем последовательно добавляли в клеточную среду в 2-кратных серийных разведениях от верхней конечной концентрации 10 мкМ

в виде полного матрикса концентраций при конечном клеточном объеме 200 мкл, и клетки затем инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Спустя 96 часов, в каждую лунку добавляли 40 мкл реагента MTS (Promega G358a), и клетки инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 5% CO₂. Наконец, измеряли поглощение при 490 нм при помощи считывающего устройства SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices), и таким образом можно предоставить концентрацию соединения, требуемую для снижения значения IC50 цисплатина, по меньшей мере до 3-кратного (до 1 десятой).

Пример 13: Активность отдельного средства против НСТ116

[00223] Соединения могут быть скринированы на активность отдельного средства против клеток НСТ116 колоректального рака при использовании 96-часового анализа на жизнеспособность клеток (MTS). НСТ116 при 470 клеток на лунку покрывали 96-луночные полистирольные планшеты (Costar 3596) в 150 мкл среды Маккойя 5А (Sigma M8403), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (JRH Biosciences 12003), раствором пенициллин/стрептомицин, разведенным 1:100 (Sigma P7539), и 2 мМ L-глутамином (Sigma G7513), и давали возможность прикрепления в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Затем к клеточной среде добавляли соединения в 2-кратных серийных разведениях от верхней конечной концентрации 10 мкМ в виде полного матрикса концентраций при конечном клеточном объеме 200 мкл, и клетки затем инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Спустя 96 часов, в каждую лунку добавляли 40 мкл реагента MTS (Promega G358a), и клетки инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 5% CO₂. Наконец, измеряли поглощение при 490 нм при помощи считывающего устройства SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices), и рассчитывали значения IC50.

Пример 14: Анализ на комплексное ингибирование ATR

[00224] Соединения скринировали на их способность ингибировать ATR киназу в присутствии белков-партнеров ATRIP, CLK2 и TopBP1, при использовании анализа включения радиоактивного фосфата. Анализы осуществляли в смеси 50 мМ Трис/НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT. Конечные концентрации субстратов составляли 10 мкМ [g-33P]АТР (3,5 μCi 33P АТР/нмоль АТР, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) и 800 мкМ целевого пептида (ASELPASQPQPFSAKКК, Isca Biochemicals, Cambridgeshire, UK).

[00225] Анализы осуществляли при 25°C в присутствии 4 нМ полноразмерного АТР, 40 нМ полноразмерного АТРIP, 40 нМ полноразмерного CLK2 и 600 нМ TopBP1(A891-S1105). Ферментативный раствор маточного буфера получали содержащим все указанные реагенты, перечисленные выше, за исключением целевого пептида, АТР и представляющего интерес тестируемого соединения. Ферментативный маточный раствор предварительно инкубировали в течение 30 минут при 25°C. 8,5 мкл ферментативного маточного раствора помещали в 96-луночный планшет с последующим добавлением 5 мкл целевого пептида и 2 мкл маточного ДМСО, содержащего серийные разведения тестируемого соединения (обычно начиная с конечной концентрации 1,5 мкМ в 2,5-кратных серийных разведениях) в двух повторах (конечная концентрации в ДМСО 7%). Планшет предварительно инкубировали в течение 10 минут при 25°C, и реакцию инициировали добавлением 15 мкл [g-33P]АТР (конечная концентрации 10 мкМ).

[00226] Реакцию останавливали спустя 20 часов добавлением 30 мкл 0,3М фосфорной кислоты, содержащей 2 мМ АТР. Фосфоцеллюлозный фильтр 96-луночного планшета (Multiscreen HTS MAPHNOB50, Merck-Millipore, Massachusetts, USA) предварительно обрабатывали 100 мкл 0,1М фосфорной кислоты перед добавлением 45 мкл останавливающей анализ смеси. Планшет промывали 5×200 мкл 0,1М фосфорной кислотой. После сушки, в лунки добавляли 50 мкл жидкого сцинтилляционного коктейля

Optiphase 'SuperMix' (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) перед сцинтилляционным подсчетом (Wallac 1450 Microbeta Liquid Scintillation Counter, Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

[00227] После удаления средних фоновых значений для всех точек данных, рассчитывали значения $K_i(\text{app})$ из данных нелинейного регрессионного анализа начальной скорости при использовании пакета программного обеспечения Prism (GraphPad Prism version 6.0c программного обеспечения Macintosh, GraphPad Inc., San Diego, USA).

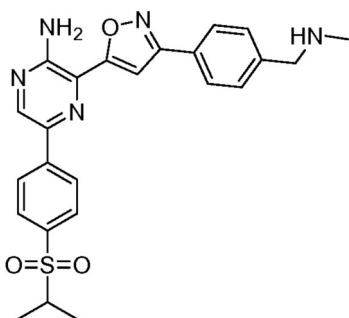
[00228] Хотя описано несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, будет очевидно, что основные примеры могут быть изменены для предоставления других вариантов осуществления, в которых используются соединения, методы и способы настоящего изобретения. Таким образом, становится очевидным, что объем настоящего изобретения определяется прилагаемыми пунктами формулы изобретения, а не конкретными вариантами его осуществления, которые были представлены в виде примеров в настоящем описании.

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения рака у пациента, включающий:

введение пациенту с раком эффективного количества соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу; и

введение пациенту эффективного количества соединения, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу, где соединение, которое ингибирует ATR, представляет собой



VE-822.

VE-822

или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий введение указанному пациенту повреждающего ДНК средства.

3. Способ по п.2, где указанное повреждающее ДНК средство вводят вместе с указанным соединением в виде единичной дозированной формы или отдельно от указанного соединения в виде части множественной дозированной формы.

4. Способ по п.2 или 3, где указанное повреждающее ДНК средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ионизирующее излучение.

5. Способ по п.4, где указанное повреждающее ДНК средство представляет собой ионизирующее излучение, радиомimetический неокарциностаин, платинирующее средство, ингибитор Торо I, ингибитор Торо II, антиметаболит, алкилирующий агент, алкилсульфонат или антибиотик.

6. Способ по п.5, где указанное повреждающее ДНК средство представляет собой цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, недаплатин, лобаплатин, триплатина тетранитрат, пикоплатин, сатраплатин, пролиндак, ароплатин, камптотецин, топотекан, иринотекан/SN38, рубитекан, белотекан, этопозид, даунорубицин, доксоорубицин, акларубицин, эпирубицин, идарубицин, амрубицин, пирарубицин, валрубицин, зорубицин,

тенипозит, аминоптерин, метотрексат, пеметрексед, ралтитрексед, пентостатин, кладрибин, клофарабин, флударабин, тиогуанин, меркаптопурин, фторурацил, капецитабин, тегуфар, кармофур, флоксуридин, цитарабин, гемцитабин, азацитидин, гидроксимочевину, мехлоретамин, циклофосфамид, ифосфаамид, трофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан, преднимустин, бендамустин, урамустин, эстрамустин, кармустин, ломустин, семустин, фотемустин, нимустин, ранимустин, стрептозоцин, бусульфан, манносульфан, треосульфан, карбоквон, тиотеп, триазиквон, триэтиленэмеламин, прокарбазин, дакарбазин, темозоломид, альтретамиин, митобронитол, актиномицин, блеомицин, митомицин или пликамицин.

7. Способ по п.5, где указанное платинирующее средство независимо выбрано из цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина, недаплатина и сатраплатина; указанный ингибитор Торо I выбран из камптотецина, топотекана, иринотекана/SN38 и рубитекана; указанный ингибитор Торо II выбран из этопозида; указанный антиметаболит выбран из метотрексата, пеметрекседа, тиогуанина, флударабина, кладрибина, цитарабина, гемцитабина, 6-меркаптопурина и 5-фторурацила; указанный алкилирующий агент выбран из азотистого иприта, нитрозомочевины, триазены, алкилсульфонатов, прокарбазина и азиридинов; и указанный антибиотик выбран из семейства гидроксимочевин, антрациклинов, антрацендионов и стрептомицетов.

8. Способ по п.5, где указанное повреждающее ДНК средство представляет собой

- (a) платинирующее средство, выбранное из цисплатина;
- (b) платинирующее средство, выбранное из карбоплатина;
- (c) ионизирующее излучение;
- (d) антиметаболит, выбранный из гемцитабина;
- (e) ингибитор Торо I, выбранный из камптотецина, топотекана, иринотекана/SN38, рубитекана и белотекана;
- (f) ингибитор Торо II, выбранный из этопозида; или
- (g) алкилирующий агент, выбранный из темозоломида.

9. Способ по п.5, где указанное повреждающее ДНК средство выбрано из одного или более из следующих: цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, этопозида, темозоломида и ионизирующего излучения.

10. Способ по любому из пп.1-9, где рак имеет дефект в эксцизионной репарации оснований белка.

11. Способ по п.10, где эксцизионной репарацией оснований белка является UNG, SMUG1, MBD4, TDG, OGG1, МУН, NTH1, MPG, NEIL1, NEIL2, NEIL3 (ДНК гликозилазы); APE1, APEX2 (AP эндонуклеазы); LIG1, LIG3 (ДНК лигазы I и III); XRCC1 (LIG3 добавочная); PNK, PNKP (полинуклеотидная киназа и фосфатаза); PARP1, PARP2(поли(ADP-рибоза)полимераза); PolB, PolG (полимераза); FEN1 (эндонуклеаза) или апраатаксин.

12. Способ по п.11, где эксцизионной репарацией оснований белка является PARP1 или PARP2.

13. Способ по любому из пп.10-12, дополнительно включающий введение данному пациенту средства, которое ингибирует или модулирует эксцизионную репарацию оснований белка.

14. Способ по п.13, где эксцизионная репарация оснований белка выбрана из PARP1 или PARP2.

15. Способ по п.14, где ингибитор или модулятор PARP1 или PARP2 представляет собой олапариб (также известный как AZD2281 или KU-0059436), велипариб (также известный как АВТ-888), рукапариб (также известный как PF-01367338), CEP-9722, INO-1001, МК-4827, E7016, BMN673 или AZD2461.

16. Способ по любому из пп.1-15, где указанный рак представляет собой солидную опухоль, выбранную из рака ротовой полости, рака легких, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочеполового тракта, рака печени, рака костей, рака нервной системы, гинекологического рака, рака кожи, рака щитовидной железы и рака надпочечников.

5 17. Способ по п.16, где указанный рак представляет собой рак ротовой полости, выбранный из рака полости рта, рака губ, рака языка и рака глотки.

18. Способ по п.16, где указанный рак представляет собой рак сердца, выбранный из саркомы, рабдомиомы и тератомы.

10 19. Способ по п.16, где рак представляет собой рак легких, выбранный из бронхогенной карциномы, альвеолярной (бронхиолярной) карциномы, бронхиальной аденомы, саркомы, лимфомы и мезотелиомы.

15 20. Способ по п.16, где рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта, выбранный из рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака тонкой кишки или тонкого кишечника, рака толстой кишки или толстого кишечника, рака ободочной кишки и рака прямой кишки.

21. Способ по п.16, где рак представляет собой рак мочеполовых путей, выбранный из рака почек, нефробластомы, рака мочевого пузыря, рака мочевыводящего канала, рака предстательной железы и рака яичек.

20 22. Способ по п.16, где рак представляет собой рак печени, выбранный из гепатомы, холангиокарциномы, гепатобластомы, ангиосаркомы, гепатоцеллюлярной аденомы и рака желчных путей.

23. Способ по п.16, где рак представляет собой рак костей, выбранный из остеогенной саркомы (остеосаркомы), фибросаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, хондросаркомы, саркомы Эвинга, злокачественной лимфомы (ретикулярной клеточной саркомы), множественной миеломы, злокачественной гигантоклеточной хордомы, хондромиксофибромы и гигантоклеточных опухолей.

24. Способ по п.16, где рак представляет собой рак нервной системы, выбранный из рака черепа, рака мозговых оболочек, рака головного мозга, медуллобластомы, глиомы, мультиформной глиобластомы, олигодендроглиомы, ретинобластомы и рака спинного мозга.

25. Способ по п.16, где рак представляет собой гинекологический рак, выбранный из рака матки, рака шейки матки, рака яичников, рака вульвы, рака влагалища, рака маточных труб и рака молочной железы.

35 26. Способ по п.16, где рак представляет собой рак кожи, выбранный из злокачественной меланомы, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, саркомы Капоши и кератоакантомы.

27. Способ по п.16, где рак представляет собой рак щитовидной железы, выбранный из папиллярной карциномы щитовидной железы, фолликулярной карциномы щитовидной железы, медуллярной карциномы щитовидной железы, множественной эндокринной неоплазии типа 2А, множественной эндокринной неоплазии типа 2В, семейного медуллярного рака щитовидной железы, феохромоцитомы и параганглиомы.

28. Способ по п.16, где рак представляет собой рак надпочечников, где рак надпочечников представляет собой нейробластому.

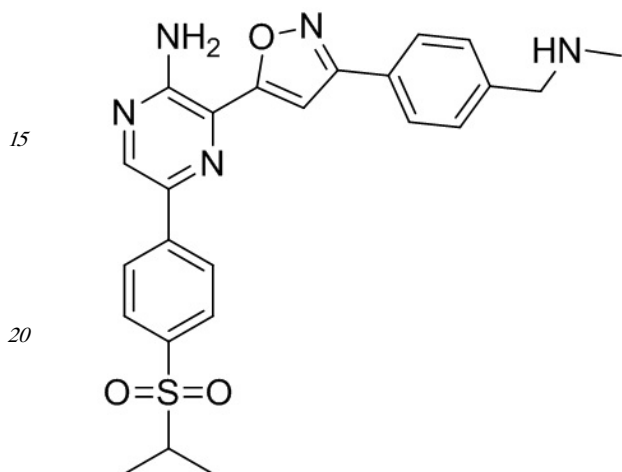
45 29. Способ по любому из пп.1-15, где указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак желчевыводящих путей, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак толстой и прямой кишки, глиобластому, рак пищевода, рак молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному или рак яичников.

30. Способ по п.29, где указанный рак выбран из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и трижды негативного рака молочной железы.

31. Способ по п.29, где дополнительное терапевтическое средство представляет собой гемцитабин или цисплатин, и рак представляет собой плоскоклеточный подтип немелкоклеточного рака легких.

32. Способ стимуляции клеточной смерти раковых клеток у пациента, включающий: введение пациенту эффективного количества соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу; и

введение пациенту эффективного количества соединения, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу, где соединение, которое ингибирует ATR протеинкиназу, представляет собой



VE-822

или его фармацевтически приемлемую соль.

33. Способ по п.32, где раковые клетки имеют дефекты в каскаде передачи сигнала ATM.

34. Способ по п.33, где дефектом является изменение экспрессии или активности одного или более из следующего: ATM, p53, CHK2, MRE11, RAD50, NBS1, 53BP1, MDC1, H2AX, MCPH1/BRIT1, STIP и SMC1.

35. Способ по п.34, где дефектом является изменение экспрессии или активности одного или более из следующего: ATM, p53, CHK2, MRE11, RAD50, NBS1, 53BP1, MDC1 и H2AX.

36. Способ по п.32, где раковая клетка экспрессирована повреждающими ДНК онкогенами.

37. Способ по п.36, где указанная раковая клетка имеет измененную экспрессию или активность одного или более из следующего: K-Ras, N-Ras, H-Ras, Raf, Мyc, Mos, E2F, Cdc25A, CDC4, CDK2, циклин E, циклин A и Rb.

38. Способ по любому из пп.1-37, где соединение, которое ингибирует Chk1, представляет собой AZD7762, LY2603618, MK-8776(SCH-900776), CHIR-124 или PF-477736.

39. Применение соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу, при изготовлении лекарственного препарата для лечения рака у пациента, где соединение, которое ингибирует ATR протеинкиназу, применяют в комбинации с соединением, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу, где соединение, которое ингибирует ATR протеинкиназу, представляет собой:

выбран из азотистого иприта, нитрозомочевины, триазены, алкилсульфонатов, прокарбазина и азиридинов; и указанный антибиотик выбран из семейства гидроксимочевин, антрациклинов, антрацендионов и стрептомицетов.

5 47. Применение по п.44, где указанное повреждающее ДНК средство представляет собой

- (a) платинирующее средство, выбранное из цисплатина;
- (b) платинирующее средство, выбранное из карбоплатина;
- (c) ионизирующее излучение;
- (d) антимаболит, выбранный из гемцитабина;

10 (e) ингибитор Торо I, выбранный из камптотецина, топотекана, иринотекана/SN38, рубитекана и белотекана;

(f) ингибитор Торо II, выбранный из этопозида; или

(g) алкилирующий агент, выбранный из темозоломида.

15 48. Применение по п.44, где указанное повреждающее ДНК средство выбрано из одного или более из следующих: цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, этопозида, темозоломида и ионизирующего излучения.

49. Применение по любому из пп.39-48, где рак имеет дефект в эксцизионной репарации оснований белка.

20 50. Применение по п.49, где эксцизионной репарацией оснований белка является UNG, SMUG1, MBD4, TDG, OGG1, МУН, NTH1, MPG, NEIL1, NEIL2, NEIL3 (ДНК гликозилазы); APE1, APEX2 (AP эндонуклеазы); LIG1, LIG3 (ДНК лигазы I и III); XRCC1 (LIG3 добавочная); PNK, PNKP (полинуклеотидная киназа и фосфатаза); PARP1, PARP2 (поли(ADP-рибоза)полимераза); PolB, PolG (полимераза); FEN1 (эндонуклеаза) или апраксина.

25 51. Применение по п.50, где эксцизионной репарацией оснований белка является PARP1 или PARP2.

52. Применение по любому из пп.49-51, дополнительно включающее применение со средством, которое ингибирует или модулирует эксцизионную репарацию оснований белка.

30 53. Применение по п.52, где эксцизионной репарацией оснований белка является PARP1 или PARP2.

35 54. Применение по п.53, где ингибитор или модулятор PARP1 или PARP2 представляет собой олапариб (также известный как AZD2281 или KU-0059436), велипариб (также известный как АВТ-888), рукапариб (также известный как PF-01367338), CEP-9722, INO-1001, МК-4827, E7016, BMN673 или AZD2461.

40 55. Применение по любому из пп.39-54, где указанный рак представляет собой солидную опухоль, выбранную из рака ротовой полости, рака легких, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочевого пузыря, рака печени, рака костей, рака нервной системы, гинекологического рака, рака кожи, рака щитовидной железы и рака надпочечников.

56. Применение по п.55, где рак представляет собой рак ротовой полости, выбранный из рака полости рта, рака губ, рака языка, рака рта и рака глотки.

57. Применение по п.55, где указанный рак представляет собой рак сердца, выбранный из саркомы, рабдомиомы и тератомы.

45 58. Применение по п.55, где рак представляет собой рак легких, выбранный из бронхогенной карциномы, альвеолярной (бронхиолярной) карциномы, бронхиальной аденомы, саркомы, лимфомы и мезотелиомы.

59. Применение по п.55, где рак представляет собой рак желудочно-кишечного

тракта, выбранный из рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака тонкой кишки или тонкого кишечника, рака толстой кишки или толстого кишечника, рака ободочной кишки и рака прямой кишки.

5 60. Применение по п.55, где рак представляет собой рак мочеполовых путей, выбранный из рака почек, нефробластомы, рака мочевого пузыря, рака мочевыводящего канала, рака предстательной железы и рака яичек.

61. Применение по п.55, где рак представляет собой рак печени, выбранный из гепатомы, холангиокарциномы, гепатобластомы, ангиосаркомы, гепатоцеллюлярной аденомы и рака желчных путей.

10 62. Применение по п.55, где рак представляет собой рак костей, выбранный из остеогенной саркомы (остеосаркомы), фибросаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, хондросаркомы, саркомы Эвинга, злокачественной лимфомы (ретикулярной клеточной саркомы), множественной миеломы, злокачественной гигантоклеточной хордомы, хондромиксофибромы и гигантоклеточных опухолей.

15 63. Применение по п.55, где рак представляет собой рак нервной системы, выбранный из рака черепа, рака мозговых оболочек, рака головного мозга, медуллобластомы, глиомы, мультиформной глиобластомы, олигодендроглиомы, ретинобластомы и рака спинного мозга.

20 64. Применение по п.55, где рак представляет собой гинекологический рак, выбранный из рака матки, рака шейки матки, рака яичников, рака вульвы, рака влагалища, рака маточных труб и рака молочной железы.

65. Применение по п.55, где рак представляет собой рак кожи, выбранный из злокачественной меланомы, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, саркомы Капоши и кератоакантомы.

25 66. Применение по п.55, где рак представляет собой рак щитовидной железы, выбранный из папиллярной карциномы щитовидной железы, фолликулярной карциномы щитовидной железы, медуллярной карциномы щитовидной железы, множественной эндокринной неоплазии типа 2А, множественной эндокринной неоплазии типа 2В, семейного медуллярного рака щитовидной железы, феохромоцитомы и параганглиомы.

30 67. Применение по п.55, где рак представляет собой рак надпочечников, где рак надпочечников представляет собой нейробластому.

35 68. Применение по любому из пп.39-54, где указанный рак выбран из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы, рака желчевыводящих путей, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рак толстой и прямой кишки, глиобластомы, рака пищевода, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы и рака яичников.

69. Применение по п.68, где указанный рак выбран из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и трижды негативного рака молочной железы.

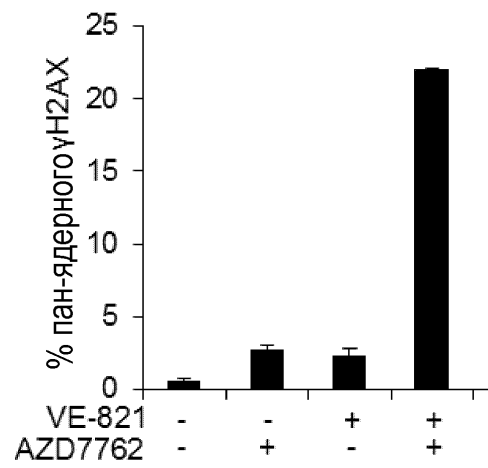
40 70. Применение по п.69, где дополнительное терапевтическое средство представляет собой гемцитабин или цисплатин, и рак представляет собой плоскоклеточный подтип немелкоклеточного рака легких.

45 71. Применение соединения, которое ингибирует ATR протеинкиназу, при изготовлении лекарственного препарата для промотирования клеточной смерти раковых клеток у пациента, где соединение, которое ингибирует ATR протеинкиназу, применяют в комбинации с соединением, которое ингибирует Chk1 протеинкиназу, где соединение, которое ингибирует ATR протеинкиназу, представляет собой

1

1/20

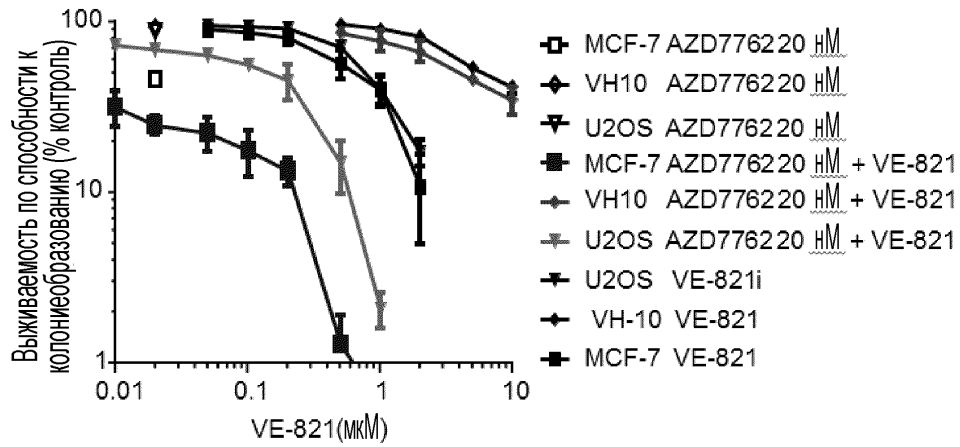
ФИГ. 1



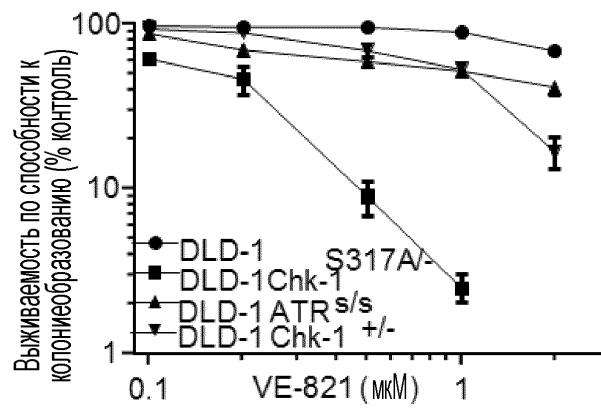
2

2/20

ФИГ. 2а

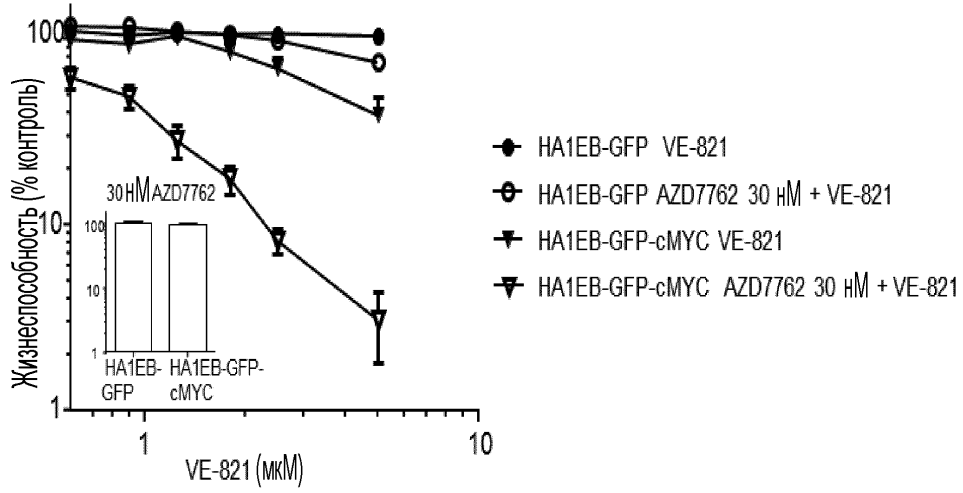


ФИГ. 2b

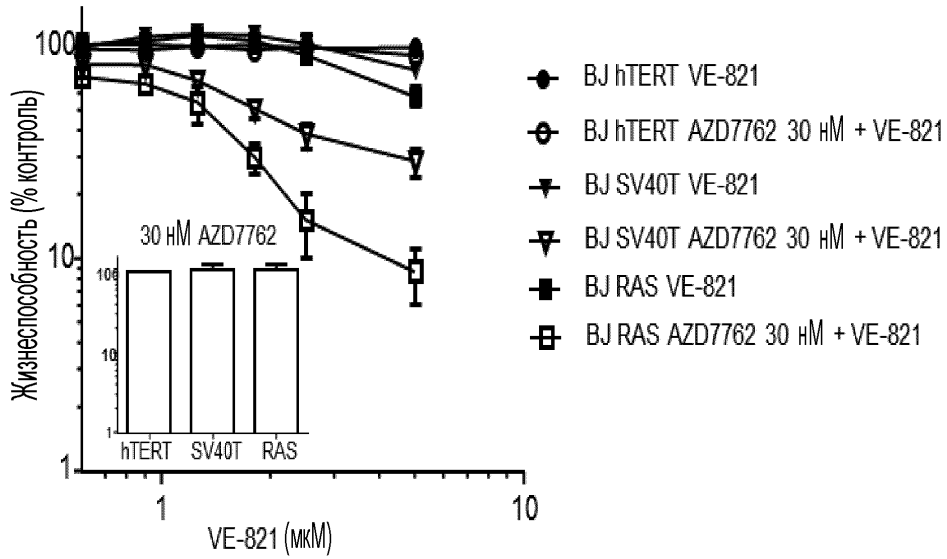


3/20

ФИГ. 2с

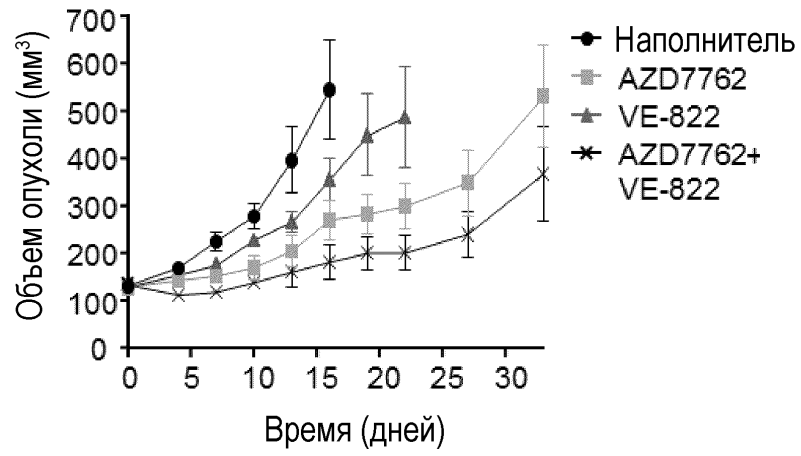


ФИГ. 2d



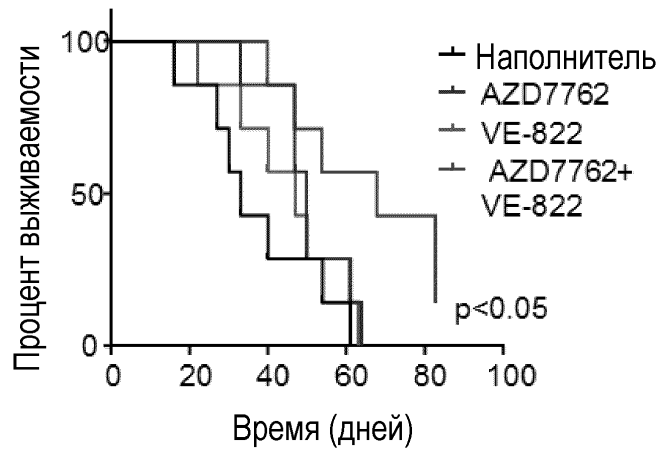
4/20

ФИГ. 3а

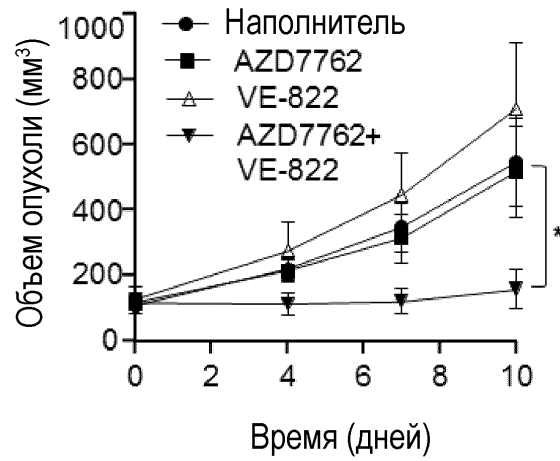


5/20

ФИГ. 3б

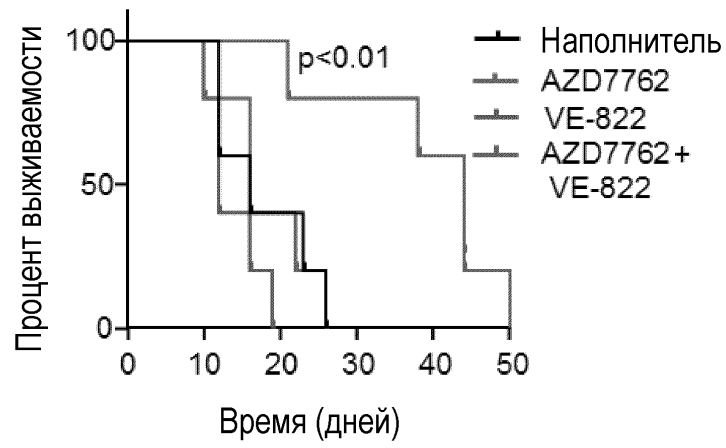


ФИГ. 4а

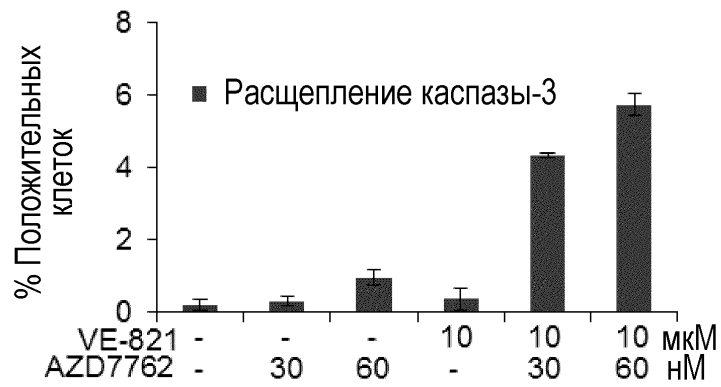


6/20

ФИГ. 4b

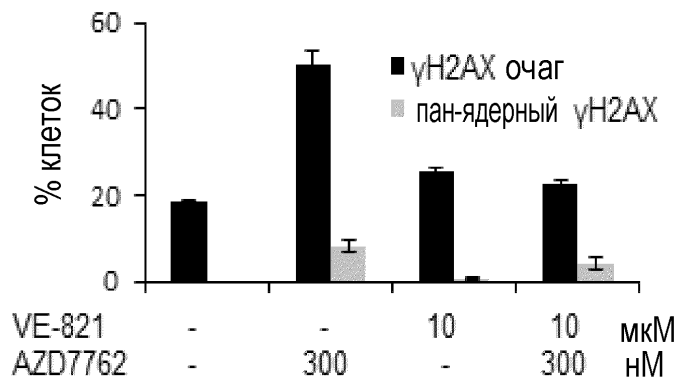


ФИГ. 5

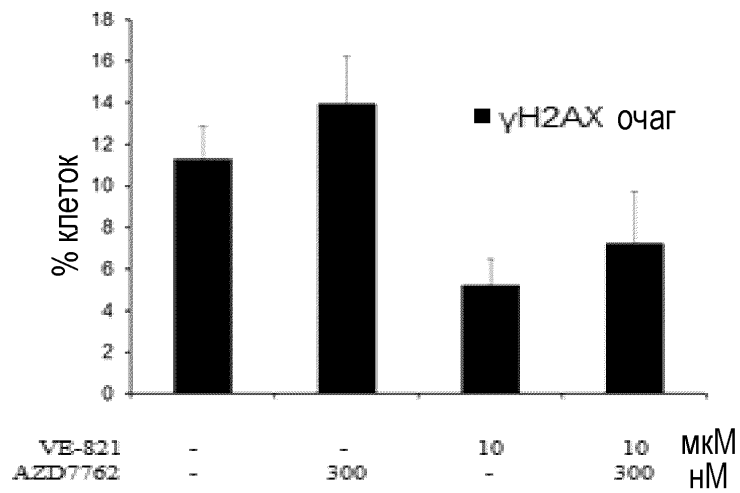


7/20

ФИГ. 6а

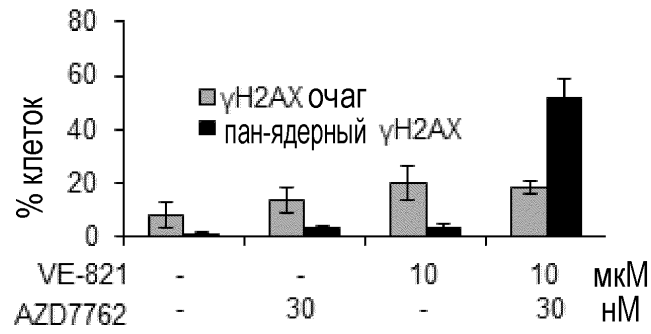


ФИГ. 6б

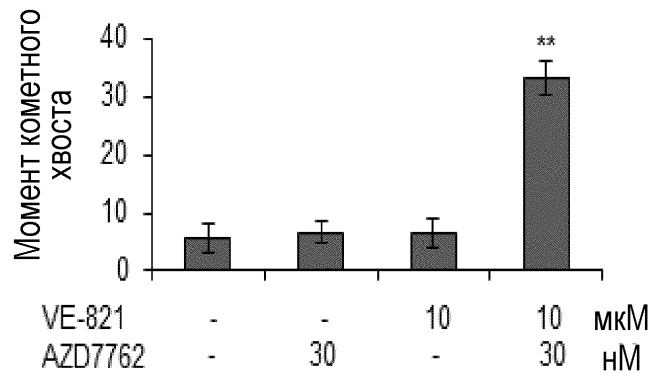


8/20

ФИГ. 6с



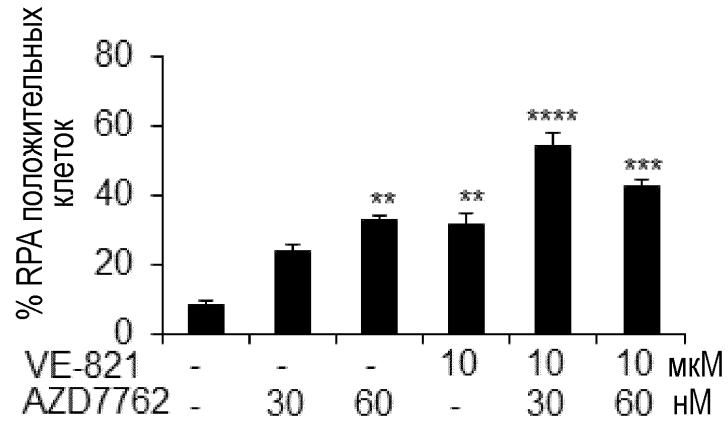
ФИГ. 6d



9/20

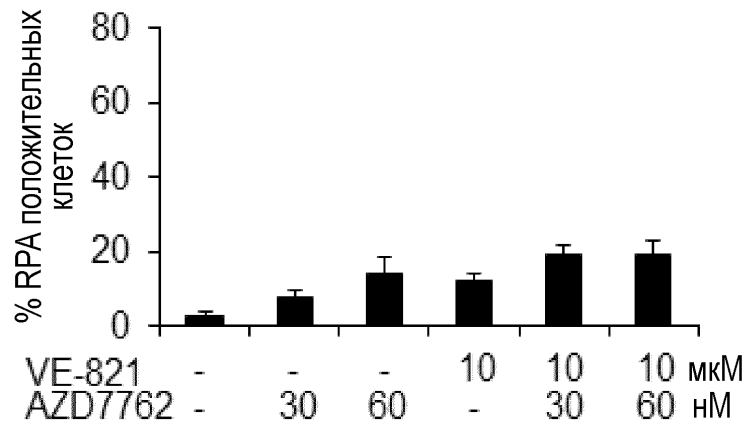
ФИГ. 7а

U2OS



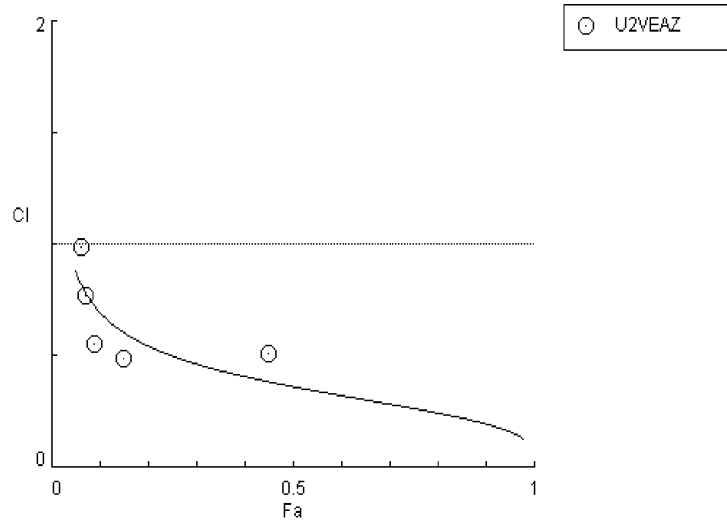
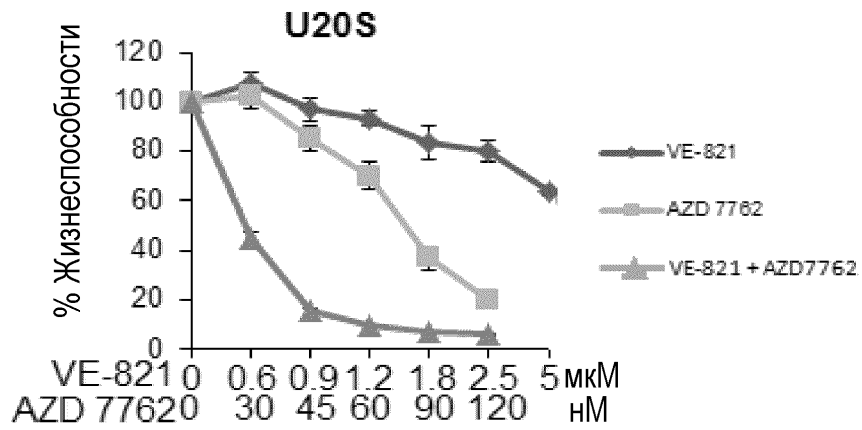
ФИГ. 7b

VH-10



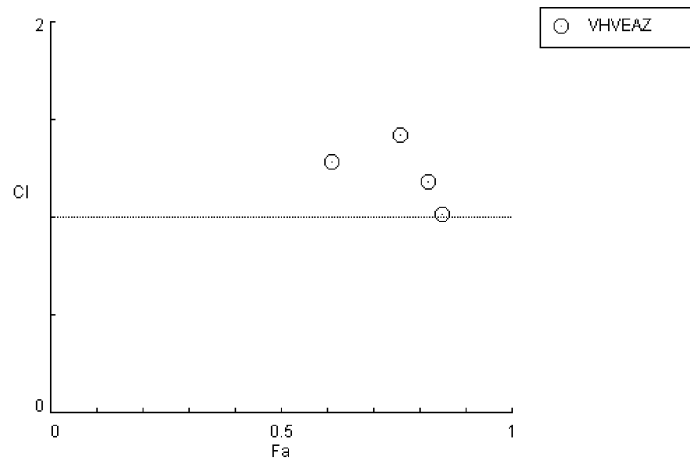
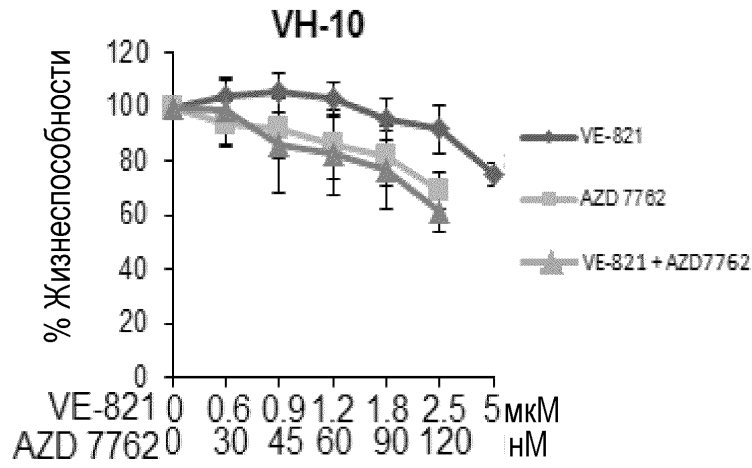
10/20

ФИГ. 8а



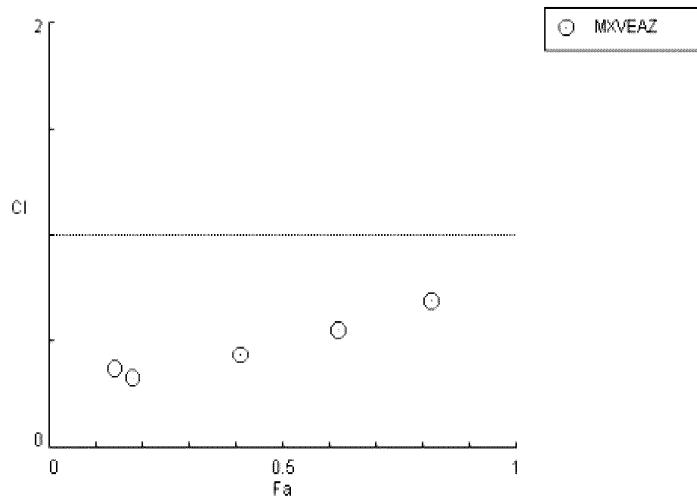
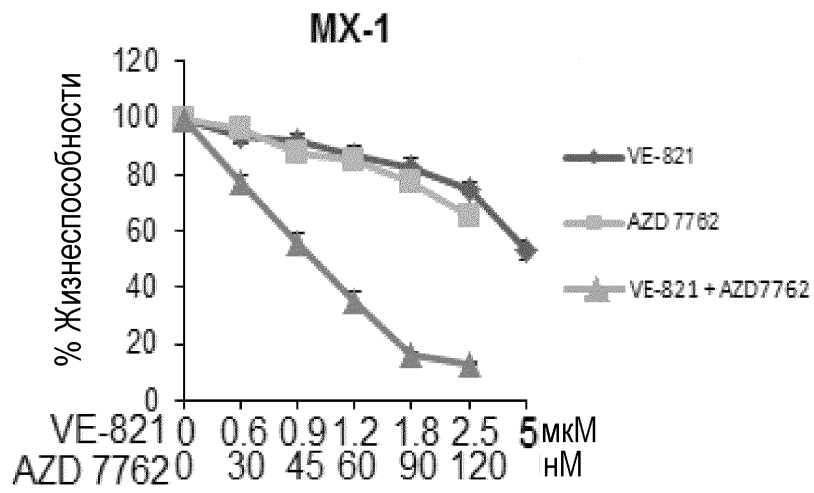
11/20

ФИГ. 8b



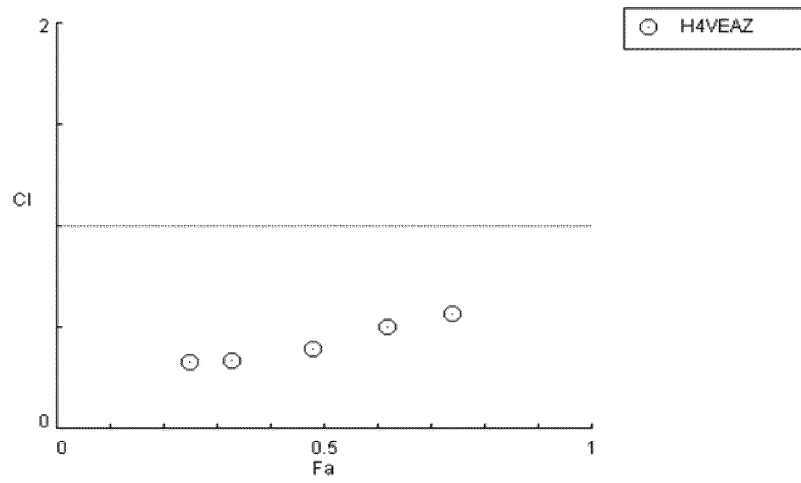
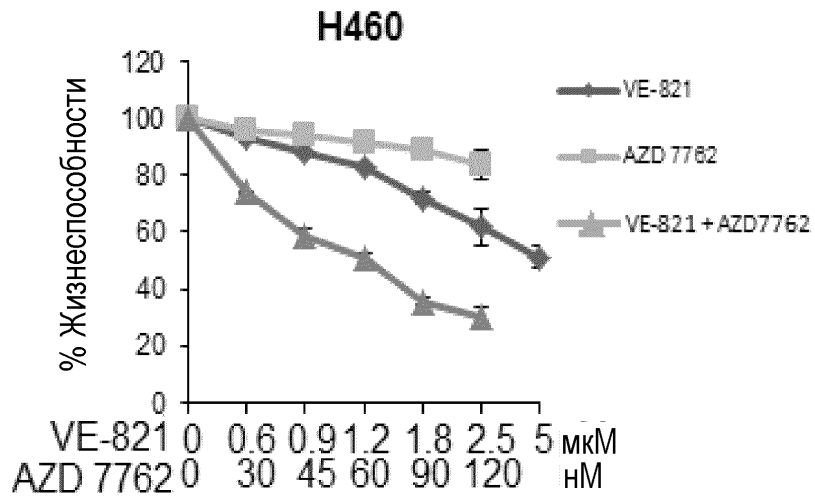
12/20

ФИГ. 8с



13/20

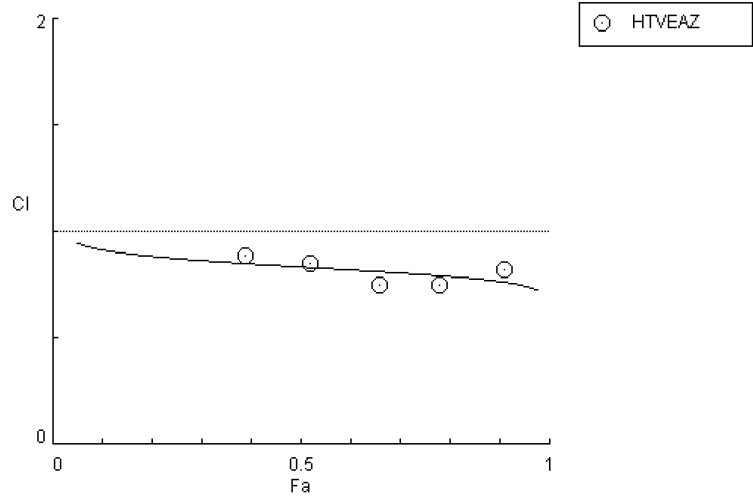
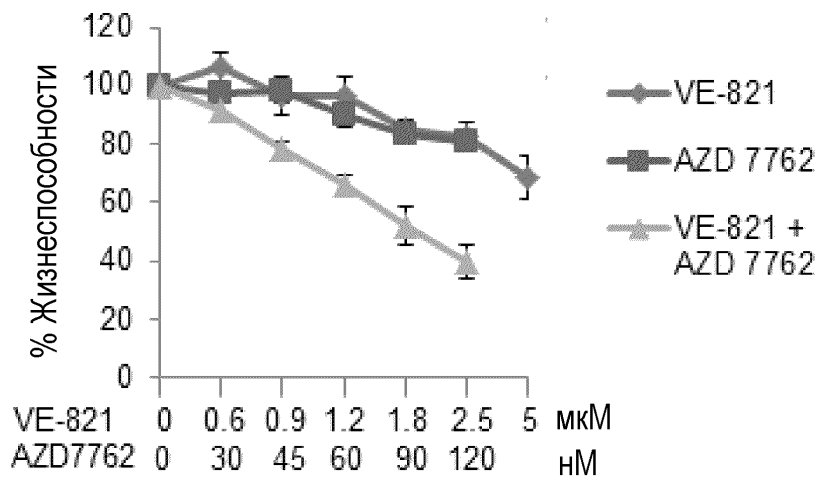
ФИГ. 8d



14/20

ФИГ. 8e

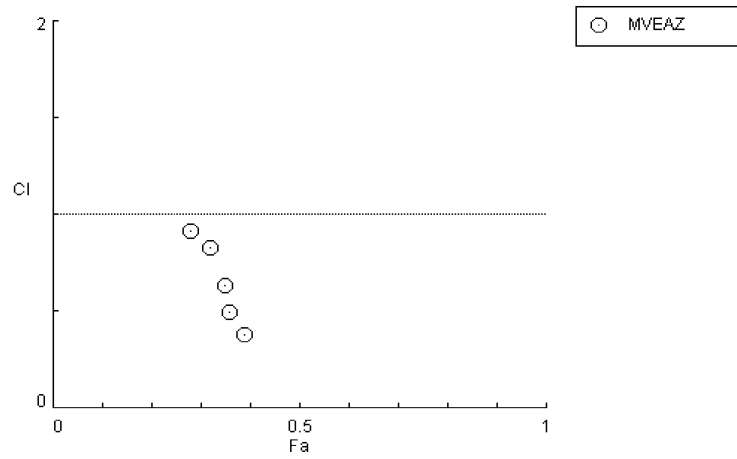
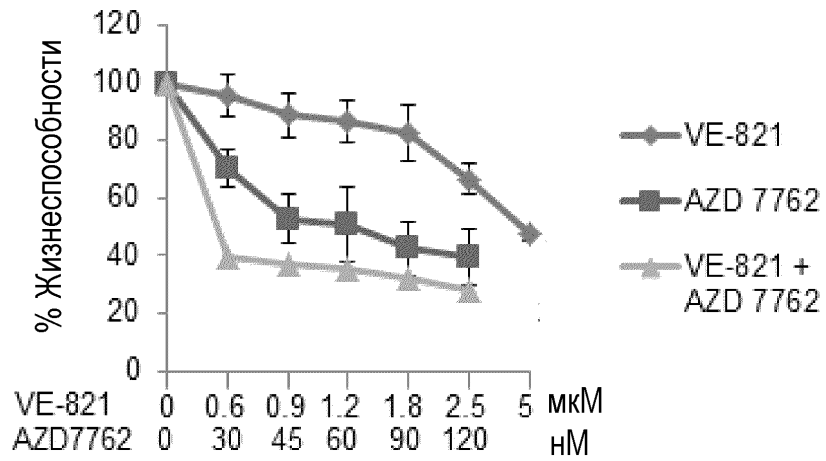
НСТ-116



15/20

ФИГ. 8f

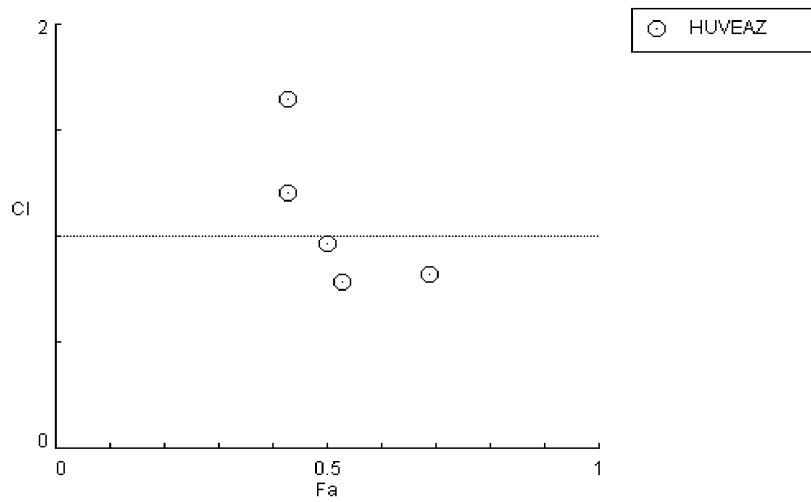
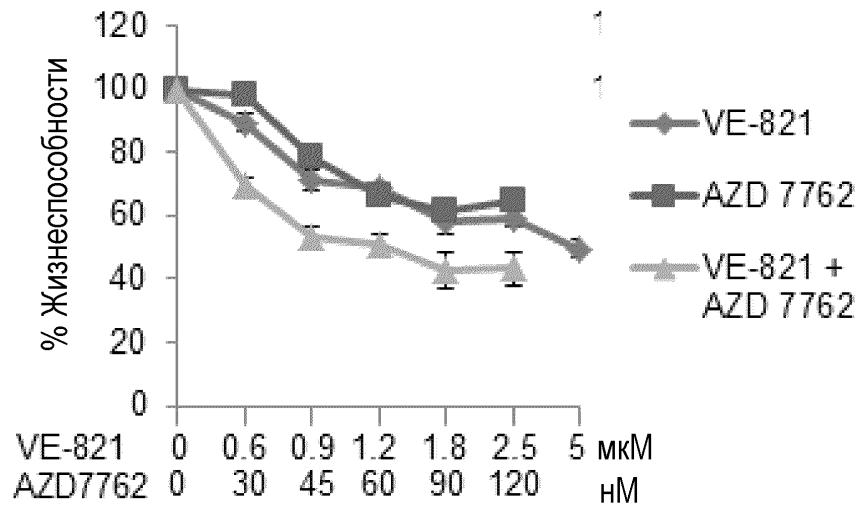
MCF7



16/20

ФИГ. 8g

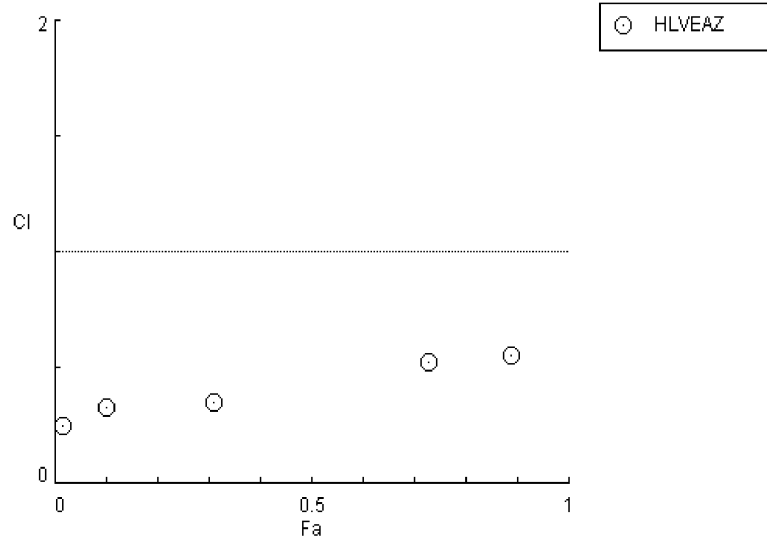
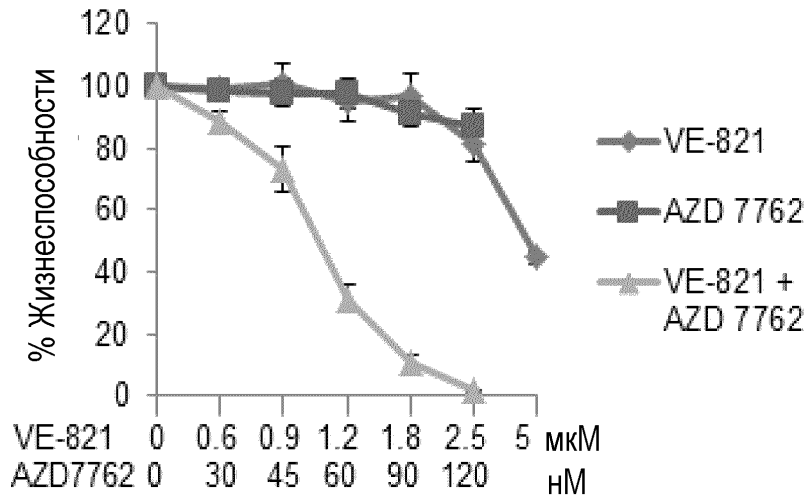
HUVAC



17/20

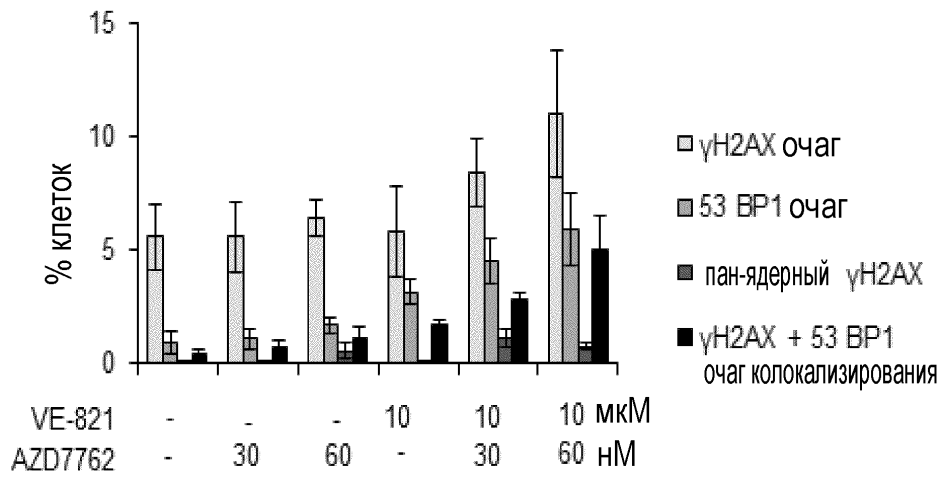
ФИГ. 8h

HL-60



18/20

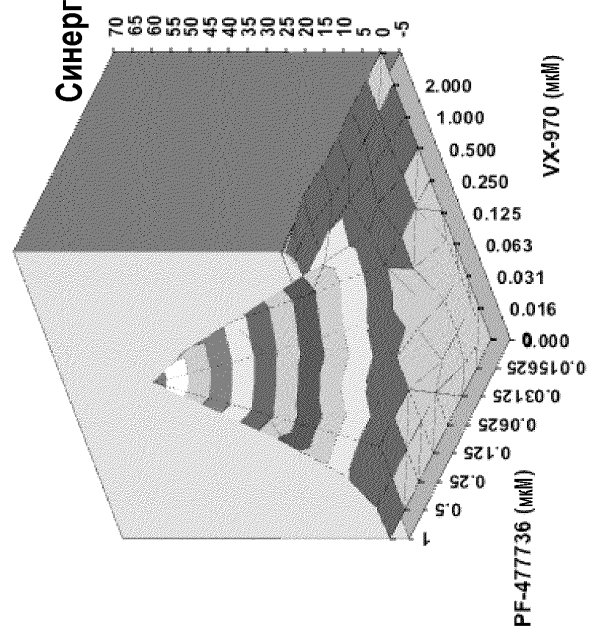
ФИГ. 9



ФИГ. 10
ПРОДОЛЖЕНИЕ

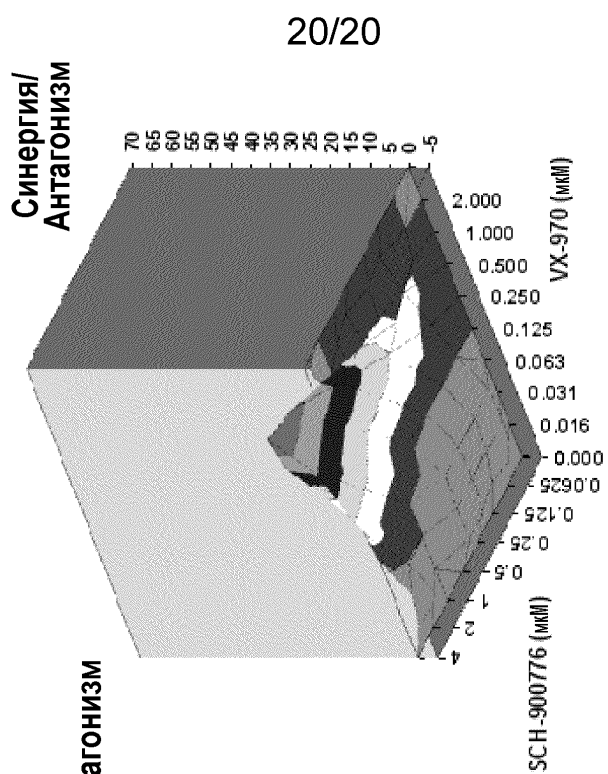
PF-477736
Chk1 0.49 нМ Ki
Chk2 47 нМ IC50

c



SCH-900776
Chk1 3 нМ Ki
Chk2 1.5 нМ IC50

d



20/20