



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122062** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C07D 401/04 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2017 05278	(72) Винахідник(и): Басисі Фіра (FR), Бере Антуан (FR), Брен Сонья (FR), Куркамбек Жером (FR), Дюбре Кларис (FR), Ніколя Ґреґорі (FR), Альфон Філіп (FR)
(22) Дата подання заявки: 26.10.2015	(73) Власник(и): ДЖЕНОСАЄНС ФАРМА, 10, rue d'Iena, 13006 Marseille, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.09.2020	(74) Представник: Опанасенко Ольга Сергіївна, реєстр. №471
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/073,325	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 1 571 146 A1, 07.09.2005 WO 2004/020431 A2, 11.03.2004
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 31.10.2014	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 26.12.2017, Бюл.№ 24	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2020, Бюл.№ 17	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/IB2015/002438, 26.10.2015	

(54) ЗАМІЩЕНІ 2,4-ДІАМІНОХІНОЛІНИ ЯК ПРОТИРАКОВІ ЗАСОБИ**(57) Реферат:**

Даний винахід стосується нових похідних 2-первинний аміно-4-вторинний аміно-хіноліну, їх отримання, фармацевтичних композицій, які їх містять, і їх застосування як лікарських засобів. Активні сполуки за даним винаходом придатні для лікування і профілактики проліферативних неопластичних і ненеопластичних захворювань.

UA 122062 C2

Даний винахід стосується нових похідних 2-первинний аміно-4-вторинний аміно-хіноліну, їх отримання, фармацевтичних композицій, які їх містять, і їхнього застосування як лікарських засобів. Активні сполуки за даним винаходом придатні для лікування і профілактики проліферативних неопластичних і ненеопластичних захворювань.

5 Рівень техніки винаходу

Відкриття нових протиракових препаратів нещодавно перейшло від клітинного аналізу до більш вузьконаправленого підходу *in vitro* на добре охарактеризованих, ізольованих і експресованих за допомогою трансфекції білках мішеней, які піддаються впливу лікарських засобів. Цей білок(білки), вибраний як об'єкт парадигми виявлення нових лікарських засобів, є добре відомим у даній галузі техніки, з великим зусиллям отриманим у галузі раціональної розробки інгібіторів кінази людини, які дозволяють досліджувати людський кіном, для виявлення нових лікарських засобів. Дійсно, людська кіназа може бути мутована, і дерегулювання кінази звичайно відбувається при злоякісній трансформації, росту та розвитку віддалених метастазів раку людини. Ця участь кінази в розвитку і поширенні раку добре відома, наприклад, при лейкемії, лімфомі, недрібноклітинному раку легені, меланомі, раку товстої кишки, раку молочної залози, раку нирки, гепатокарциномі. У даний час, незважаючи на це велике зусилля, націлене на порушення функції кінази людини в деяких ракових захворюваннях, клінічний прорив застосування інгібіторів кінази в протираковій терапії очевидно не пов'язаний з лікуванням або ремісією, а деякі ракові захворювання, очевидно, залишаються за природою резистентними до клінічного застосування інгібіторів кінази (наприклад, гепатоцелюлярна карцинома). Крім того, інгібітори кінази можуть вибирати *in vivo* деякі мутовані і резистентні штами, або трансформовані клітини можуть знайти в однаковій мірі компенсаційні шляхи. У цьому контексті ми вирішили врахувати весь клітинний компартмент і середовище клітинної культури з розвитком об'єктивного фенотипічного клітинного скринінгового дослідження. Більше того, молекулярне розуміння і молекулярний опис клітинної трансформації, росту раку і розвитку метастазів усе ще залишаються в постійному розвитку, наприклад, нещодавній опис концепції ракових стовбурових клітин (CSC) або пухлино-ініціювальних клітин (TIC). Несподівані ефекти при клітинному скринінгу можуть свідчити про інші мішені або специфічні взаємодії для виявлення нової мішені, яка піддається впливу лікарських засобів. Тому розробка нових протиракових засобів усе ще залишається унікальною проблемою з непередбаченим результатом і місцем для відкриття нових і інноваційних сполук.

Винахідники отримали нову бібліотеку ряду різнобічно орієнтованих 2-первинний аміно-2-вторинний аміно-арилхінолінових сполук, для якої виконували скринінг стосовно набору клітинних ліній раку людини (MOLM14, KG-1, MV4-11, A375, HCT116, HepG2, huh-7, MDA-MB-231, CAKI-1, 786-O) і отриманих від пацієнтів первинних клітин раку, які дозволяють виявляти нові протиракові засоби. Більше того, цей клас сполук в однаковій мірі виявляє додаткову активність проти людських ракових стовбурових клітин (CSC), яким широко інкримінують повторний прояв і рецидив раку після протиракової терапії. Добре відомий у даній галузі техніки ALDH-аналіз використовували як функціональний маркер ракових стовбурових клітин для опису активності проти CSC (Greve, B. в співавт. Cytometry A 2012 (81) 284-293, Liu, S. в співавт. PLoS One 2013 (25) e81050, Ran, D. в співавт. Exp. Hematol. 2009 (37) 1423-1434, Cheung, A. M. в співавт. Leukemia 2007 (21) 1423-1430, Pearce, D. J. в співавт. Stem Cells 2005 (23) 752-760).

Таким чином, метою даного винаходу є надання активних засобів для запобігання або інгібування клітинної проліферації в різних організмах і надання способів їхнього синтезу.

45 Іншою метою даного винаходу є надання фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість активних засобів за винаходом, окремо або в комбінації з іншими активними засобами, і фармацевтично прийнятний ад'ювант, розріджувач або носій.

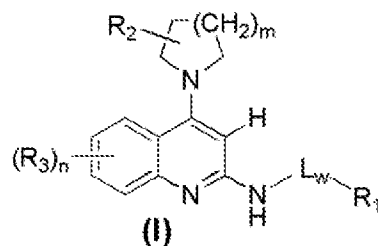
Іншою метою даного винаходу є надання активних засобів для застосування в терапії.

50 Іншою метою даного винаходу є надання способу лікування і/або профілактики проліферативного і/або неопластичного захворювання.

Іншою метою даного винаходу є надання способу інгібування росту або диференціювання ракової стовбурової клітини (CSC), пухлино-ініціювальної клітини, мезенхімальноподібної клітини, пов'язаної з раком, мезенхімальної ракової клітини або мезенхімальної клітини.

Суть винаходу

55 У даному винаході запропонована сполука формули (I)



у якій

R₁ може бути вибраний з C6-C10 арилу, заміщеного або не заміщеного R₉; гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S, заміщеного або не заміщеного R₉; конденсованого гетероарила згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю, заміщеного або не заміщеного R₉;

L_w може бути вибраний з необов'язково заміщеного (C1-C10) алкілу; (C1-C10) алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного R₄; необов'язково заміщеного (C3-C10) циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10) циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкінілу; C=O; SO; SO₂; (C=O)-NR₈; (C=O)-O; (C=O)-O-(C1-C4)алкілу; SO₂-NR₈; NR₈; де R₄ може бути вибраний з H; необов'язково заміщеного (C1-C10) алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10) циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10) циклоалкінілу; необов'язково заміщеного (C6-C10) арилу; гетероарильного 5-8-членного кільця або конденсованого гетероарила згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю, заміщеного або не заміщеного однією або декількома групами замісників, незалежно вибраних з водню, атома галогену, (C1-C10) алкілу, заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C1-C10) алкокси, гідроксилу, ціано, нітро, карбокси, NR₈R₈; 4-9-членного насиченого або ненасиченого кільця, яке містить 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S;

R₂ вибраний з NR₅R₆;

R₃ може бути вибраний з атома водню; атома галогену; (C1-C10) алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, гідроксилу, алкокси, -NR₅R₆; (C2-C10) алкенілу; (C2-C10) алкінілу; (C3-C10) циклоалкілу; (C5-C10) циклоалкенілу; (C8-C10) циклоалкінілу; (C1-C10) алкокси; гідроксилу; нітро; ціано; NR₅R₆; O-(R₇); (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)-NR₅R₆; O-(CO)-R₇; O-(CO)-NR₅R₆; NR₅-(CO)-R₇; NR₅-(CO)-OR₇; NR₅-(CO)-NR₅R₆; -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁; SO₂-R₇; NR₅-SO₂-R₇; SO₂-NR₅R₆; NR₅-(C2-C6)-алкил-NR₅R₆; необов'язково заміщеного арилу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеного конденсованого гетероарила згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю; необов'язково заміщеного гетероциклічного 4-9-членного кільця, насиченого або ненасиченого, яке утримує 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S;

R₅ і R₆ можуть бути незалежно вибрані з водню; необов'язково заміщеного (C1-C10) алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10) циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10) циклоалкінілу; (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)-NR₈R₈; SO₂-R₇; SO₂-NR₈R₈; (C1-C10) алкілу, заміщеного NR₈R₈; (C3-C10) циклоалкілу, заміщеного NR₈R₈; необов'язково заміщеного арилу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеного гетероциклічного 4-9-членного кільця, насиченого або ненасиченого, яке містить 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S; або R₅ і R₆ можуть бути зв'язані разом з атомом азоту, до якого вони ковалентно приєднані, з утворенням гетероциклічної групи, яка утворює 4-9-членне кільце, яке може містити додаткові 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

R₇ і R₇ можуть бути незалежно вибрані з водню; необов'язково заміщеного (C1-C10) алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10) циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10) циклоалкінілу; C1-C10 лінійного або розгалуженого алкілу, заміщеного NR₈R₈; необов'язково заміщеного (C6-C10) арилу;

необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероароматичного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

R_8 і R_8' можуть бути незалежно вибрані з водню; необов'язково заміщеного (C1-C10) алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10) циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10) циклоалкінілу; або R_8 і R_8' можуть бути зв'язані разом з атомом азоту, до якого вони ковалентно приєднані, з утворенням гетероциклічної групи, яка утворює 4-9-членне кільце, яке може містити додаткові 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

R_9 може бути незалежно вибраний з водню; атома галогену; необов'язково заміщеного (C1-C10) алкілу; (C1-C10) алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного одним або декількома атомами галогену, гідроксилем, алкокси; необов'язково заміщеного (C2-C10) алкенілу; необов'язково заміщеного (C2-C10) алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10) циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10) циклоалкінілу; або R_9 і R_9' можуть бути зв'язані разом з атомом азоту, до якого вони ковалентно приєднані, з утворенням гетероциклічної групи, яка утворює 4-9-членне кільце, яке може містити додаткові 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; NR_5R_6 ; (CO)- R_7 ; (CO)-O- R_7 ; (CO)- NR_5R_6 ; O-(CO)- R_7 ; O-(CO)- NR_5R_6 ; NR_5 -(CO)- R_7 ; NR_5 -(CO)-OR $_7$; NR_5 -(CO)- NR_5R_6 ; SO $_2$ - R_7 ; NR_5 -SO $_2$ - R_7 ; SO $_2$ - NR_5R_6 ; (C1-C10) алкілу, заміщеного NR_5R_6 ; NR_5 -(C2-C10)-алкіл- NR_5R_6 ; $-(O-CH_2CH_2)_m-OR_{11}$; $-(O-CH_2CH_2)_m-NR_{11}R_{11}'$; необов'язково заміщеного (C6-C10) арилу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеної гетероциклічної групи, яка утворює 4-9-членне кільце, яке може містити 1, 2 або 3 гетероатоми, вибраних із O, N і S; - NR_5R_{10} ; -O- R_{10} ;

R_{10} може бути незалежно вибраний з водню; (C6-C12)-арилу, заміщеного або не заміщеного R_{12} ; бензилу, заміщеного або не заміщеного R_{12} ; гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S, заміщеного або не заміщеного R_{12} ; конденсованого гетероарилу, визначеного як такий, що утримує від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю, заміщеного або не заміщеного R_{12} ; гетероциклілу, який утворює 4-9-членне кільце, яке може містити 0, 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S, заміщеного або не заміщеного R_{12} ;

R_{11} і R_{11}' можуть бути незалежно вибрані з атома водню; необов'язково заміщеного (C2-C10) алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10) циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10) циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10) циклоалкінілу; (C2-C10) алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену; або R_{11} і R_{11}' можуть бути поєднані разом з атомом азоту, до якого вони ковалентно приєднані, з утворенням гетероциклічної групи, яка утворює насичене або ненасичене 4-9-членне кільце, яке може містити додаткові 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

R_{12} може бути вибраний з атома водню; атома галогену; (C1-C10) алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, гідроксилем, алкокси, $NR_{11}R_{11}'$; (C2-C10) алкенілу; (C2-C10) алкінілу; (C3-C10) циклоалкілу; (C5-C10) циклоалкенілу; (C8-C10) циклоалкінілу; (C1-C10) алкокси; гідроксилу; нітро; ціано; $NR_{11}R_{11}'$; O-(R_7); (CO)- R_7 ; (CO)-O- R_7 ; (CO)- $NR_{11}R_{11}'$; O-(CO)- R_7 ; O-(CO)- $NR_{11}R_{11}'$; NR_{11} -(CO)- R_7 ; NR_{11} -(CO)-OR $_{11}$; NR_{11} -(CO)- $NR_{11}R_{11}'$; $-(O-CH_2CH_2)_m-OR_{11}$; $-(O-CH_2CH_2)_m-NR_{11}R_{11}'$; SO $_2$ - R_7 ; NR_5 -SO $_2$ - R_7 ; SO $_2$ - $NR_{11}R_{11}'$; NR_{11} -(C2-C6)-алкіл- $NR_{11}R_{11}'$; необов'язково заміщеного арилу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеного конденсованого гетероарилу згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю; необов'язково заміщеного гетероциклічного 4-9-членного кільця, насиченого або ненасиченого, яке утримує 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S;

n може являти собою рівне ціле число, яке може мати будь-яке зі значень 0, 1, 2, 3 або 4;

m може являти собою рівне ціле число, яке може мати будь-яке зі значень 1, 2 або 3;

w може являти собою рівне ціле число, яке може мати будь-яке зі значень 0 або 1;

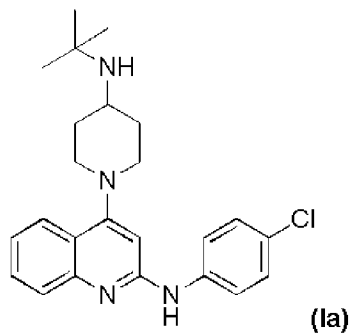
Де термін "необов'язково заміщений" означає необов'язково заміщений одним або декількома замісниками, незалежно вибраними з атома галогену, (C1-C10) алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C2-C10) алкенілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C2-C10) алкінілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C3-C10) циклоалкілу, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C5-C10) циклоалкенілу, заміщеного

або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C8-C10) циклоалкілілу, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C1-C10) алкокси, гідроксилу, ціано, нітро, NR_8R_8' (з R_8 і R_8' , як описано вище);

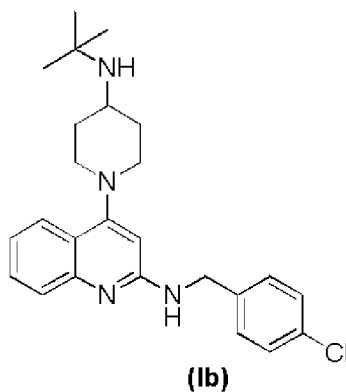
і будь-які її фармацевтично прийнятна сіль, сольват, ізомери, стереоізомери або суміші
5 стереоізомерів, сольват або проліки.

У деяких конкретних варіантах здійснення винахід надає сполуку, вибрану з:

2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну формули (Ia) (1-5)

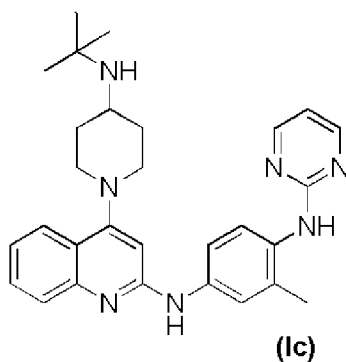


2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну формули (Ib) (2-2)



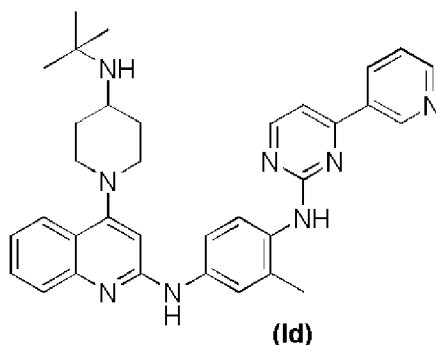
10

2-[3-метил-4-(піримідин-2-іламіно)феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (3-4) формули (Ic)



15

2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (4-2) формули (Id)



або його фармацевтично прийнятної солі, сольвату або проліків.

У деяких інших конкретних варіантах здійснення винахід надає сполуку, вибрану з гідрохлоридної солі 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (1-6), гідрохлоридної солі 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (2-3), гідрохлоридної солі 2-[3-метил-4-(піримідин-2-іламіно)феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (3-5), гідрохлоридної солі 2-[4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (4-3).

В іншому аспекті винахід надає фармацевтичну композицію, яка може містити терапевтично ефективну кількість вищезазначеної сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, сольвату або проліків і фармацевтично прийнятний ад'ювант, розріджувач або носій.

У деяких окремих варіантах здійснення фармацевтична композиція за винаходом може додатково містити один або декілька протипухлинних засобів.

У деяких окремих варіантах здійснення вищезазначена фармацевтична композиція може містити терапевтично ефективну кількість сполуки за винаходом, яка може знаходитися в складі або знаходитися в комбінації в складі наночастинок.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом наночастинок можуть містити лізосомальну біорозкладану композицію.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом наночастинок можуть містити біосумісний полімер або співполімер.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом наночастинок можуть бути зв'язані ковалентно або нековалентно з поліетиленгліколем (PEG).

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом наночастинок можуть мати середній розмір від приблизно 80 до приблизно 600 нм.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом наночастинок може бути специфічною наночастиною, яка містить сигнальний мотив.

У деяких конкретних варіантах здійснення наночастинок можуть містити полімерну біорозкладану композицію.

У деяких окремих конкретних варіантах здійснення полімер може бути оснований на полі(DL-молочна-со-гліколева кислота), який може мати молекулярну масу від 7 до 240 кДа; або співполімері полімолочної кислоти (PLA) і полігліколевої кислоти (PGA), де молекулярне співвідношення може знаходитися в інтервалі від 95:5 до 50:50.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом наночастинок можуть містити елемент, вибраний із наночастинок PLGA, наночастинок PLGA-PEG (блок типу AB, BA, ABA або BAB, де A=PLGA і B=PEG) і специфічних наночастинок.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом наночастинок можуть містити елемент, вибраний з ліпосом.

У деяких варіантах здійснення фармацевтична композиція за винаходом може бути придатною для уповільненого або пролонгованого вивільнення.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція за винаходом може бути придатною для перорального, парентерального, офтальмологічного, трансдермального, назального введення або для інгаляції.

У деяких конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом активна сполука за винаходом може діяти спільно щонайменше з одним терапевтично активним протипухлинним засобом.

У певному конкретному варіанті здійснення фармацевтична композиція за винаходом може містити комбінацію терапевтично ефективної кількості сполуки за винаходом і терапевтично ефективної кількості одного або декількох протипухлинних засобів, де компоненти, які складають зазначену комбінацію, можуть бути призначені для одночасного, окремого або

послідовного застосування в терапії раку.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичної композиції за винаходом протипухлинний засіб може бути вибраний з групи, яка складається з еверолімусу, хлорохіну, гідроксихлорохіну, трабектедину, абраксану, TLK 286, AV-299, DN-101, пазопанібу, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, ензастаурину, вандетанібу, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, пеметрекседу, ерлотинібу, дазатанібу, нілотинібу, декатанібу, панітумумабу, амрубіцину, ореговомабу, Lep-etu, нолатрекседу, azd2171, батабуліну, офатумумабу, занолімумабу, едотекарину, тетрандрину, рубітекану, тесміліфену, облімерсену, тицилімумабу, іпілімумабу, госиполу, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, циклітіду, гіматекану, IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, люкантону, LY 317615, нейрадіабу, вітеспану, Rta 744, Sdx 102, талампанелю, атрасентану, Xr 311, ромідепсину, ADS-100380, сунітинібу, 5-фторурацилу, вориностату, етопозиду, гемцитабіну, доксорубіцину, іринотекану, ліпосомального доксорубіцину, 5'-дезоксид-5-фторуридину, вінкристину, темозоломід, ZK-304709, селіциклібу, PD0325901, AZD-6244, капецитабіну, динатрієвої солі N-[4-[2-2-аміно-4,7-дигідро-4-оксо-1H-піроло[2,3-d]піримідин-5-іл)етил]бензоїл]-L-глутамінової кислоти гептагідрату, камптотецину, PEG-міченого іринотекану, тамоксифену, цитрату тореміфену, анастразолу, екземестану, летрозолу, DES (діетилстильбестрол), естрадіолу, естрогену, кон'югованого естрогену, бевацизумабу, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(метилсульфонілпіперазинметил)-індоліл]-хінолону, ваталанібу, AG-013736, AVE-0005, ацетатної солі [D-Ser(But)₆, Azgly₁₀] (піро-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ ацетат, гозереліну ацетат), лейпроліду ацетату, триптореліну памоату, медроксипрогестерону ацетату, гідроксипрогестерону капроату, мегестролу ацетату, ралоксифену, бікалутаміду, флутаміду, нілутаміду, мегестролу ацетату, CP-724714; TAK-165, HKI-272, ерлотинібу, лапатанібу, канертинібу, ABX-EGF-антитіла, ербітуксу, EKB-569, PKI-166, GW-572016, лонафарнібу, BMS-214662, типіфарнібу; аміфостину, NVP-LAQ824, субероїланілідгідроксамової кислоти, вальпроєвої кислоти, трихостатину A, FK-228, SU11248, сорафенібу, KRN951, аміноглутетиміду, амсакрину, анагреліду, L-аспарагінази, вакцини на основі бацили Кальметта-Герена (BCG), блеоміцину, бусереліну, бусульфану, карбоплатину, кармустину, хлорамбуцилу, цисплатину, кладрибіну, клодронату, ципротерону, цитарабіну, дакарбазину, дактиномицину, даунорубіцину, діетилстилбестролу, епірубіцину, флударабіну, флуорокортизону, флуоксиместерону, флутаміду, гемцитабіну, глівеку, гідроксисечовини, ідарубіцину, іфосфаміду, іматинібу, лейпроліду, левамизолу, ломустину, мехлоретаміну, мелфалану, 6-меркаптопурину, месни, метотрексату, мітоміцину, мітотану, мітоксантрону, нілутаміду, октреотиду, оксаліплатину, памідронату, пентостатину, плікаміцину, порфімеру, прокарбазину, ралтітрекседу, ритуксимабу, стрептозоцину, теніпозиду, тестостерону, талідоміду, тіогуаніну, тіотепи, третиноїну, віндезину, 13-цис-ретиноевої кислоти, фенілаланіну мустарду, урацилу мустарду, естрамустину, алтретаміну, флоксуридину, 5-дезоксіуридину, цитозинарабінозиду, 6-меркаптопурину, дезоксикоформіцину, кальцитріолу, валрубіцину, мітраміцину, вінбластину, вінорелбіну, топотекану, разоксину, маримастату, COL-3, неовастату, BMS-275291, скваламіну, ендостатину, SU5416, SU6668, EMD121974, інтерлейкіну-12, 1M862, ангіостатину, вітаксину, дролоксифену, ідоксифену, спіронолактону, фінастериду, цимітидину, трастузумабу, денілейкіну дифтитоксу, гефитинібу, бортезимибу, паклітакселу, іринотекану, топотекану, доксорубіцину, доцетакселу, вінорелбіну, бевацизумабу (моноклональне антитіло) і ербітуксу, який не містить кремофору паклітакселу, епітілону B, BMS-247550, BMS-310705, дролоксифену, 4-гідрокситамоксифену, піпендоксифену, ERA-923, арзоксифену, фулвестранту, аколбіфену, лазофоксифену, ідоксифену, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK222584, VX-745, PD 184352, рапаміцину, 40-O-(2-гідроксіетил)рапаміцину, темсиролімусу, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, вортманіну, ZM336372, L-779450, PEG-філграстиму, дарбепоетину, еритропоетину, колонієстимулюючого фактора гранулоцитів, золендронату, преднізону, цетуксімабу, колонієстимулюючого фактора гранулоцитів-макрофагів, гістреліну, пегільованого інтерферону альфа-2а, інтерферону альфа-2а, пегільованого інтерферону альфа-2b, інтерферону альфа-2b, азацитидину, PEG-L-аспарагінази, леналідоміду, гемтузумабу, гідрокортизону, інтерлейкіну-11, декстразоксану, алемтузумабу, повністю транс-ретиноевої кислоти, кетоконазолу, інтерлейкіну-2, мегестролу, азотистого іприту, метилпреднізолону, ібритгумомаб тіуксетану, андрогенів, децитабіну, гексаметилмеламіну, бексаротену, тозитумумабу, триоксиду миш'яку, кортизону, едитронату, мітотану, циклоспорину, ліпосомного даунорубіцину, аспарагінази Едвіна, стронцію 89, касопітанту, нетупітанту, антагоністів рецептора NK-1, палоносетрону, апрепітанту, дифенгідраміну, гідроксизину, метоклопраміду, лоразепаму, алпразоламу, галоперидолу, дроперидолу, дронабінолу, дексаметазону,

метилпреднізолону, прохлорперазину, гранісетрону, ондансетрону, доласетрону, тропісетрону, пегфілграстиму, епоетину альфа і дарбепоетину альфа, іпілумабу, вемурафенібу, інгібітору FLT-3, інгібітору VEGFR, інгібітору TK EGFR, інгібітору авророкінази, модулятора PIK-1, інгібітору Bcl-2, інгібітору HDAC, інгібітору c-MET, інгібітору PARP, інгібітору Cdk, інгібітору TK EGFR, інгібітору IGFR-TK, антитіла проти HGF, інгібіторів кінази PI3, інгібітору mTOR, інгібітору AKT, інгібітору JAK/STAT, інгібітору контрольної точки 1 або 2, інгібітору кінази фокальної адгезії, інгібітору кінази Мар-кінази (МЕК), антитіла-пастки VEGF та їхніх сумішей.

В іншому аспекті винахід надає спосіб лікування і/або профілактики проліферативного і/або неопластичного захворювання, який може включати стадію введення терапевтично активної кількості сполуки за винаходом або фармацевтичної композиції, яка містить її, людині або тварині, що потребує цього.

В іншому аспекті винахід надає спосіб інгібування росту або диференціювання ракової стовбурової клітини (CSC), пухлино-ініціювальної клітини, мезенхімальноподібної клітини, пов'язаної з раком, мезенхімальної ракової клітини або мезенхімальної клітини, який може включати стадію введення терапевтично активної кількості сполуки за винаходом або фармацевтичної композиції, яка містить її, людині або тварині, що потребує цього.

В іншому аспекті даний винахід надає сполуку для лікування і/або профілактики проліферативного і/або неопластичного захворювання.

В іншому аспекті винахід надає сполуку для інгібування росту або диференціювання ракової стовбурової клітини (CSC), пухлино-ініціювальної клітини, мезенхімальноподібної клітини, пов'язаної з раком, мезенхімальної ракової клітини або мезенхімальної клітини.

Короткий опис креслень

Вищезгадані та інші характеристики і переваги винаходу стануть більш очевидними з наступних прикладів і з посиланням на прикладені креслення, на яких:

Фігура 1 демонструє зменшення популяції клітин з ALDH+ у клітинах, отриманих від пацієнтів з CRC (CPP19, CPP30 і CPP45), при впливі сполукою 2-3 (аналіз Aldefluor™);

Фігура 2 демонструє інгібування сполукою 2-3 утворення пухлинних сфер із клітин, отриманих від пацієнтів з метастазуючим у печінку раком товстої кишки (CRC);

Фігура 3 демонструє спектр ^1H ЯМР сполуки 1-6 у DMSO- d_6 ;

Фігура 4 демонструє спектр ^1H -ЯМР сполуки 2-3 у DMSO- d_6 ;

Фігура 5 демонструє спектр ^1H ЯМР сполуки 3-5 у DMSO- d_6 ;

Фігура 6 демонструє спектр ^1H ЯМР сполуки 4-3 у DMSO- d_6 ;

Детальний опис

У даному описі термін "алкіл", сам по собі або в сполученні з іншими групами, належить до одновалентного насиченого аліфатичного вуглеводневого радикалу з розгалуженим або лінійним ланцюгом з одного до двадцяти атомів вуглецю, переважно з одного до шістнадцяти атомів вуглецю, більш переважно з одного до десяти атомів вуглецю.

Термін "нижчий алкіл", сам по собі або в комбінації, означає алкілну групу з лінійним ланцюгом або розгалуженим ланцюгом з 1-6 атомами вуглецю (" C_1 - C_6 -алкіл"), переважно алкілну групу з лінійним або розгалуженим ланцюгом з 1-5 атомами вуглецю (" C_1 - C_5 -алкіл"), і особливо переважно алкілну групу з лінійним або розгалуженим ланцюгом з 1-3 атомами вуглецю (" C_1 - C_3 -алкіл"). Прикладами нижчих алкільних груп з лінійним або розгалуженим ланцюгом є метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, ізобутіл, трет-бутіл, ізомерні пентили, ізомерні гексили, переважно метил і етил, і пропіл, і ізопропіл, і найбільш переважний метил.

Термін "нижчий алкокси" належить до групи $\text{R}'\text{-O-}$, де R' являє собою нижчий алкіл, і термін "нижчий алкіл" має раніше дане значення. Прикладами нижчих алкоксигруп є метокси, етокси, н-пропокси, ізопропокси, н-бутокси, ізобутокси, втор-бутокси і трет-бутокси, переважно метокси і етокси, і ізопропокси, і трет-бутокси, найбільш переважні метокси і етокси.

Термін "нижчий алкеніл" означає вуглеводневий залишок з лінійним ланцюгом або розгалуженим ланцюгом, який містить олефіновий зв'язок і від 2 до 6 атомів вуглецю (" C_2 - C_6 -алкеніл"), переважно від 2 до 5 атомів вуглецю (" C_2 - C_5 -алкеніл"), особливо переважно від 2 до 4 атомів вуглецю (" C_2 - C_4 -алкеніл"). Прикладами нижчих алкенільних груп є етеніл, 1-пропеніл, 2-пропеніл, ізопропеніл, 1-бутеніл, 2-бутеніл, ізобутеніл, 1-пентеніл, 2-пентеніл, 3-пентеніл, ізопентеніл. Переважними прикладами є 2-пропеніл, 2-бутеніл і ізопентеніл.

Термін "нижчий алкініл" означає вуглеводневий залишок з лінійним ланцюгом або розгалуженим ланцюгом, який містить алкіновий зв'язок і від 2 до 6 атомів вуглецю (" C_2 - C_6 -алкініл"), переважно від 2 до 5 атомів вуглецю (" C_2 - C_5 -алкініл"), особливо переважно від 2 до 4 атомів вуглецю (" C_2 - C_4 -алкініл"). Прикладами алкінільних груп є етиніл, 1-пропініл, 2-пропініл, 1-бутиніл, 3-бутиніл, 4-бутиніл, 1-бут-2-ин, 1-пентиніл, пент-2-ин-1-іл, пент-3-ин-1-іл, пент-4-ин-1-іл, пент-2-ин-3-іл. Переважними прикладами є пропін-1-іл, пропін-3-іл, бутин-1-іл, бутин-3-іл,

бутин-4-іл, бут-2-ин-1-іл.

Термін "галоген" належить до фтору, хлору, бромі і йоду, причому більш переважними є фтор, хлор і бром.

Термін "циклоалкіл" означає насичену карбоциклічну групу, яка містить від 3 до 7 атомів вуглецю ("C₃-C₇-циклоалкіл"), таку як циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил або циклогептил. Переважними циклоалкілами є циклопропіл, циклопентил і циклогексил.

Термін "гетероциклічна група" означає повністю насичені або ненасичені, але не повністю ненасичені, наприклад, 3-7-членні моноциклічні групи або 7-11-членні конденсовані біциклічні кільцеві системи, які мають щонайменше один гетероатом, вибраний з атома кисню, атома азоту або атома сірки. Кожне кільце гетероциклічної групи може мати щонайменше один гетероатом, вибраний з атомів азоту, атомів кисню і/або атомів сірки. Переважними гетероциклічними групами є піролідін, піперидин, піперазин, тетрагідрофуран, біс-тетрагідрофуран і морфолін.

Термін "карбоксил" означає групу -COOH.

Термін "гетероарил", як правило, належить до ароматичного 5- або 11-членного кільця, яке містить щонайменше один гетероатом і може додатково містити один, два, три або чотири атоми, вибрані з азоту, кисню і/або сірки, такого як піридил, піразиніл, піримідиніл, піридазиніл, 2-оксо-1,2-дигідропіридиніл, оксадіазоліл, ізоксазоліл, тіадіазоліл, триазоліл, тетразоліл, піразоліл, імідазоліл, тіофеніл, фураніл, оксазоліл, ізотіазоліл і тіазоліл. Термін "гетероарил" додатково належить до біциклічних ароматичних або частково ненасичених груп, які містять два 5- або 6-членні кільця, у яких одне або обидва кільця можуть містити один, два, три або чотири атоми, вибрані з азоту, кисню або сірки, таких як хінолініл, ізохінолініл, цінолініл, піразоліл, імідазоліл, тіазоліл, тіофеніл, фураніл, оксазоліл, ізотіазоліл, піразоло[1,5-а]піридил, імідазо[1,2-а]піридил, хіноксалініл, хіназоліл, бензотіазоліл, бензотриазоліл, 1H-бензо[d]імідазол, бензо[d]ізоксазоліл, бензо[d]ізотіазоліл, бензо[c]ізоксазоліл, бензо[c]ізотіазоліл, індоліл, ізоіндолініл, 6,7-дигідро-5H-піроло[3,4-b]піридиніл, 2,3-дигідро-1H-піроло[3,4-c]піридиніл, 6,7-дигідро-5H-піроло[3,4-d]піримідиніл, пуриніл, індазоліл, індолізиніл, імідазо[1,2-а]піридиніл, імідазо[1,5-а]піридиніл, імідазо[1,5-а]піразиніл, імідазо[1,2-а]піразиніл, 1H-імідазо[4,5-b]піразиніл, піразоло[1,5-а]піридиніл, піроло[1,2-а]піримідиніл, піроло[1,2-а]піразиніл, піроло[1,2-c]піримідиніл, оксазоло[4,5-b]піридиніл, оксазоло[4,5-c]піридиніл, оксазоло[5,4-c]піридиніл, оксазоло[5,4-b]піридиніл, тіазоло[4,5-b]піридиніл, тіазоло[4,5-c]піридиніл, тіазоло[5,4-c]піридиніл, тіазоло[5,4-b]піридиніл, оксазоло[5,4-d]піримідиніл, оксазоло[4,5-d]піримідиніл, тіазоло[5,4-d]піримідиніл, тіазоло[4,5-d]піримідиніл, оксазоло[4,5-b]піразиніл, тіазоло[4,5-b]піразиніл, ізоксазоло[4,5-b]піразиніл, ізотіазоло[4,5-b]піразиніл, ізоксазоло[4,5-d]піримідиніл, ізотіазоло[4,5-d]піримідиніл, ізоксазоло[5,4-d]піримідиніл, ізотіазоло[5,4-c]піридиніл, ізоксазоло[4,5-c]піридиніл, ізоксазоло[4,5-b]піридиніл, ізоксазоло[4,5-b]піридиніл, ізоксазоло[4,3-d]піримідиніл, ізоксазоло[3,4-d]піримідиніл, ізотіазоло[3,4-d]піримідиніл, піридо[2,3-d]піримідиніл, піридо[3,4-d]піримідиніл, піридо[4,3-d]піримідиніл, піридо[3,2-d]піримідиніл, піридо[2,3-b]піразиніл, піридо[3,4-b]піразиніл, [1,2,3]триазоло[4,5-b]піридиніл, [1,2,3]триазоло[4,5-c]піридиніл, 3H-[1,2,3]триазоло[4,5-d]піримідиніл. Переважними гетероарильними групами є піридил, тіазоліл, ізотіазоліл, оксазоліл, ізоксазоліл, хінозолініл і піразиніл.

Термін "фармацевтично прийнятні солі" стосується тих солей, які зберігають біологічну ефективність і властивості вільних основ або вільних кислот, які не є біологічно або іншим способом небажаними. Солі утворюють з неорганічними кислотами, такими як хлористоводнева кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота тощо, переважно хлористоводнева кислота, і органічними кислотами, такими як оцтова кислота, пропіонова кислота, гліколева кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, малеїнова кислота, малінова кислота, саліцилова кислота, бурштинова кислота, фумарова кислота, винна кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, глутарова кислота, корична кислота, мигдальна кислота, яблучна кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота, п-толуолсульфонова кислота, бензолсульфонова кислота, N-ацетилцистеїн тощо. Крім того, ці солі можуть бути отримані за допомогою приєднання неорганічної основи або органічної основи до вільної кислоти. Солі, отримані з неорганічної основи, включають, але не обмежуються ними, солі натрію, калію, літію, амонію, кальцію, магнію тощо. Солі, отримані з органічних основ, включають, але не обмежуються ними, солі первинних, вторинних і третинних амінів, заміщених амінів, включаючи заміщені аміни, що зустрічаються в природі, циклічних амінів і основних іонообмінних смол, таких як ізопропіламін, триметиламін, діетиламін, триетиламін, трипропіламін, етаноламін, лізин, аргінін, N-етилпіперидин, піперидин, поліамінні смоли тощо.

Сполуки формули I можуть також бути присутніми у формі цвітер-іонів.

Особливо переважними фармацевтично прийнятними солями сполук формули I є гідрохлоридні солі.

Сполуки формули I також можуть бути сольватовані, наприклад, гідратовані. Сольватація може бути здійснена в ході процесу отримання або може мати місце, наприклад, як наслідок гігроскопічних властивостей початково безводної сполуки формули I або II (гідратація). Термін "фармацевтично прийнятні солі" також включає фізіологічно прийнятні сольвати.

"Ізомери" являють собою сполуки, які мають однакові молекулярні формули, але які розрізняються за природою або послідовністю зв'язування їхніх атомів або по розташуванню їхніх атомів у просторі. Ізомери, які відрізняються розташуванням їхніх атомів у просторі, називаються "стереоізомерами". Стереоізомери, які не є дзеркальними відображеннями один одного, називаються "діастереоізомерами", а стереоізомери, які є незбіжними при накладенні дзеркальними відображеннями, називаються "енантіомерами" або іноді оптичними ізомерами.

У контексті даного опису терміни "суб'єкт" або "пацієнт" використовуються взаємозамінно. У контексті даного опису терміни "суб'єкт" і "суб'єкти" стосуються тварини (наприклад, птахів, рептилій і ссавців), переважно ссавців, включаючи непримата (наприклад, верблюда, осла, зебру, корову, свиню, коня, козу, вівцю, кішку, собаку, пацюка і мишу) і примата (наприклад, мавпу, шимпанзе і людину), і найбільш переважно людину.

У контексті даного опису терміни "терапевтичні засоби" і "терапія" можуть стосуватися будь-якого протоколу (протоколів), способу (способів), композицій, складів і/або засобу (засобів), які можуть бути використані для профілактики, лікування або полегшення захворювання, включаючи вірусні або бактеріальні інфекції або пов'язані з ними симптоми, ракові захворювання і т.д. У деяких варіантах здійснення терміни "терапевтичні методи" і "терапія" стосуються біологічної терапії, підтримуючої терапії і/або інших терапевтичних засобів, придатних для лікування, стримування розвитку, профілактики або полегшення різних захворювань, відомих фахівцю в даній галузі техніки.

Термін "терапевтично ефективна кількість" сполуки означає кількість сполуки, яка є ефективною для запобігання, полегшення або пом'якшення симптомів захворювання або продовження виживання суб'єкта, який піддається лікуванню. Визначення терапевтично ефективною кількості знаходиться в межах кваліфікації фахівця в даній галузі техніки. Терапевтично ефективна кількість або дозування сполуки за даним винаходом може варіюватися в широких межах і може бути визначена способом, відомим у даній галузі техніки. Таке дозування буде коректуватися з урахуванням індивідуальних вимог у кожному конкретному випадку, включаючи конкретну сполуку(сполуки), яка вводиться, спосіб введення, стан, який піддається лікуванню, а також пацієнта, якого піддають лікуванню. Як правило, у випадку перорального або парентерального введення дорослим людям масою приблизно 70 кг добова доза складає від 0,1 до 5 г, переважно від приблизно 0,1 до приблизно 1 г, більш переважно від 0,5 до 500 мг і найбільш переважно від приблизно 1 мг до 300 мг, проте, якщо зазначено, верхня межа може бути перевищена. Добову дозу можна вводити у вигляді разової дози або у вигляді розділених доз, або для парентерального введення її можна вводити у вигляді безперервної інфузії.

Термін "фармацевтично прийнятний носій" призначений для включення будь-яких і всіх матеріалів, сумісних з фармацевтичним введенням, включаючи розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні агенти й агенти, які сповільнюють абсорбцію, а також інші матеріали і сполуки, сумісні з фармацевтичним введенням. За винятком тих випадків, коли будь-яке звичайне середовище або агент несумісні з активною сполукою, можливість використання їх у композиціях за винаходом розглядається. У композиції можуть бути також включені додаткові активні сполуки. Ці композиції можуть бути отримані шляхом застосування відомих у даній галузі техніки методик, описаних у книгах Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (десяте видання) 2014, за редакцією Loyd Allen, Howard C. Ansel, видавництво Wolters Kluwer Health і Remington: The Science and Practice of Pharmacy (двадцять друге видання) 2012, за редакцією Loyd V. Allen, видавництво Pharmaceutical Press, кожна з яких включена у даний опис за допомогою посилання.

У контексті даного опису терміни "лікувати", "лікування" і "лікуючий" стосуються, у контексті введення терапевтичного засобу(засобів) суб'єкту для лікування вірусної інфекції, одного, двох, трьох, чотирьох, п'ятьох або більше з наступних ефектів, які виникають у результаті введення терапевтичного засобу або комбінації терапевтичних засобів: (i) ослаблення або полегшення тяжкості захворювання і/або пов'язаного з ним симптому; (ii) скорочення тривалості захворювання і/або пов'язаного з ним симптому; (iii) регресія захворювання і/або пов'язаного з ним симптому; (iv) зниження титру збудника захворювання; (v) зниження виразності органної

недостатності, пов'язаної з захворюванням; (vi) зменшення випадків госпіталізації суб'єкта; (vii) скорочення тривалості госпіталізації; (viii) збільшення виживання суб'єкта; (ix) усунення інфекції; (X) інгібування прогресування інфекції і/або пов'язаного з нею симптому; (xi) запобігання поширенню вірусу з клітини, тканини або суб'єкта в іншу клітину, тканину або суб'єкт; і/або (xii) посилення або поліпшення терапевтичного ефекту іншого терапевтичного засобу.

"Проліки" означає сполуку, яка піддається перетворенню в сполуку за винаходом усередині біологічної системи. Проліки являють собою хімічне похідне, неактивне або менш активне, ніж самі ліки. Після введення і дифузії в організмі пролікарське похідне піддається одному або декільком метаболічним процесам, які вивільняють активний лікарський засіб. Перетворення проліків в лікарський засіб зазвичай здійснюють під контролем ферментативних процесів (зазвичай за допомогою метаболічного шляху, наприклад, гідролізу, відновлення або окиснення) і рідше класичними хімічними реакціями під час його дифузії в організмі. Сполучний місток між носієм і лікарським засобом може являти собою, але не обмежуючись ними, складний ефір, амід, карбонат, карбамат, імін, ацеталь, ефір (наприклад, глюкозо-кон'югація), окисну функціональну групу і молекулярну систему, відновлювальну функціональну групу і відновлювальну молекулярну систему, фотоактивовану функціональну групу і фотоактивовану молекулярну систему. Наприклад, складноефірні проліки сполуки, які містять гідроксильну групу, можуть бути перетворені шляхом гідролізу *in vivo* у вихідну молекулу. Придатними складними ефірами сполук за винаходом, які містять гідроксильну групу, є, наприклад, ацетати, цитрати, лактати, тартрати, малонати, оксалати, саліцилати, пропіонати, сукцинати, фумарати, малеати, метилен-біс-β-гідроксинафтоати, гестисати, ізетіонати, ди-п-толуолтартрати, метансульфонати, етансульфонати, бензолсульфонати, п-толуолсульфонати, циклогексилсульфамати і хінати. Як інший приклад складноефірні проліки сполуки за винаходом, які містять карбоксигрупу, можуть бути перетворені шляхом гідролізу *in vivo* у вихідну молекулу (приклади складноефірних проліків описані F.J. Leinweber, *Drug Metab. Res.* 1987, (18) pp379, включеної в даний опис за допомогою посилання). Аналогічно, ацильні проліки сполуки, які містять аміногрупу, можуть бути перетворені шляхом гідролізу *in vivo* у вихідну молекулу (приклади проліків для цих і інших функціональних груп, включаючи амін, спирт, описані в книгах *Prodrugs: Challenges and Rewards* (Частини 1 і 2); Ed V. Stella, R. Borchardt с соавт., Springer, 2007, і *Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties* Ed. J. Rautio, Seies Ed. R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers. Wiley-VCH 2011, кожна з яких включена в даний опис за допомогою посилання).

Система носіїв проліків звичайно використовується для збільшення розчинності у воді або ліпідах, зниження токсичності, підвищення хімічної і біологічної стабільності чутливої сполуки, збільшення часу циркуляції в організмі ($T_{1/2}$), збільшення загальної експозиції лікарського засобу (AUC) і розподілу по органах (визначення ФК-ФД профілю) і сайт-специфічного впливу.

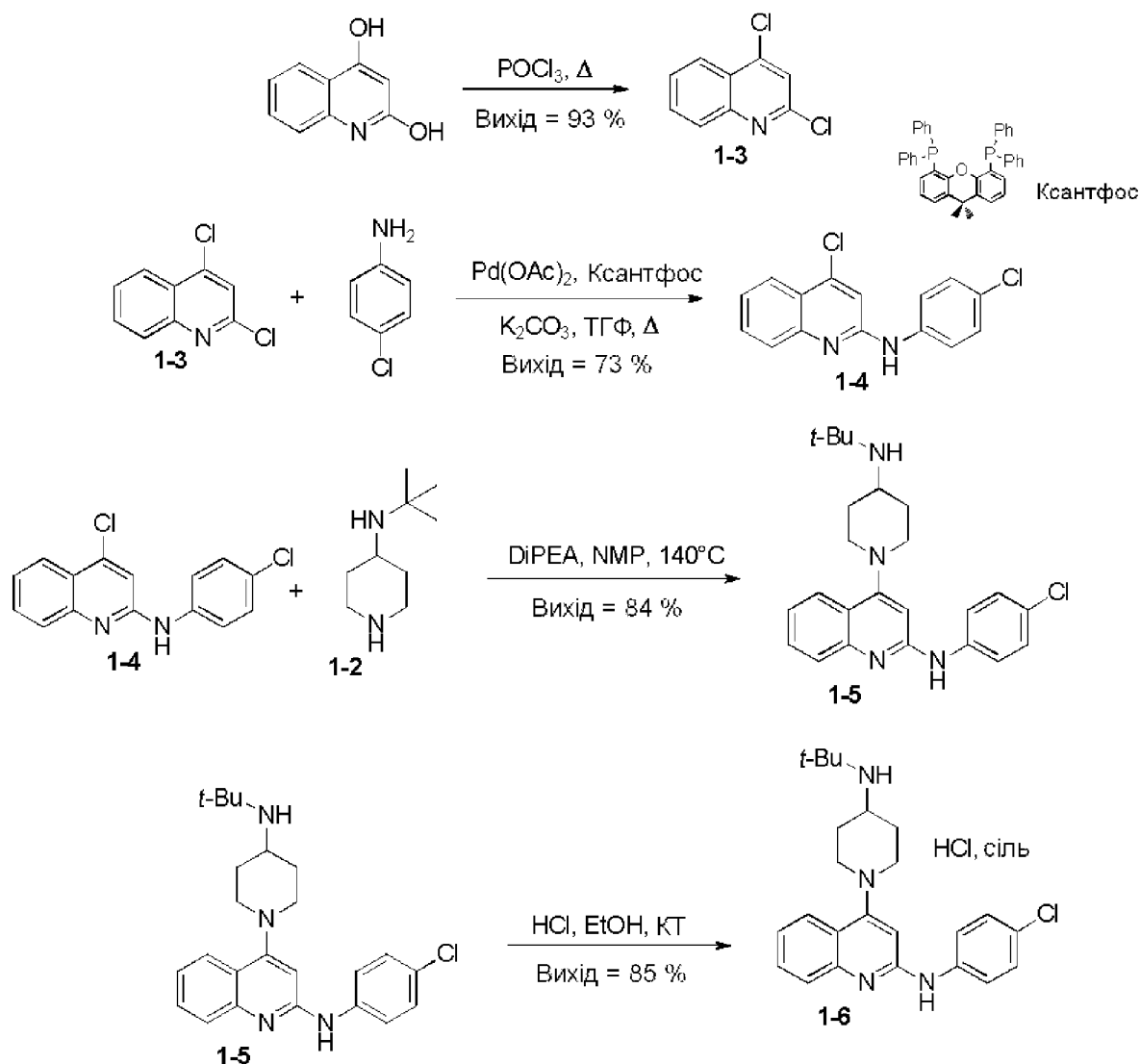
Речовини і способи, які стосуються прикладів 1, 2, 3 і 4

Реагенти і розчинники отримували від комерційних постачальників і використовували без додаткового очищення. Сухий метиленхлорид сушили і переганяли над CaCl_2 і зберігали над молекулярними ситами $4\text{\AA}$ в атмосфері аргону. Тетрагідрофуран сушили над натрієм/бензофенон-кетилем в атмосфері аргону і переганяли перед використанням. Очищення флеш-хроматографією проводили на силікагелі Merck (40-63 мкм або 15-40 мкм) як нерухому фазу.

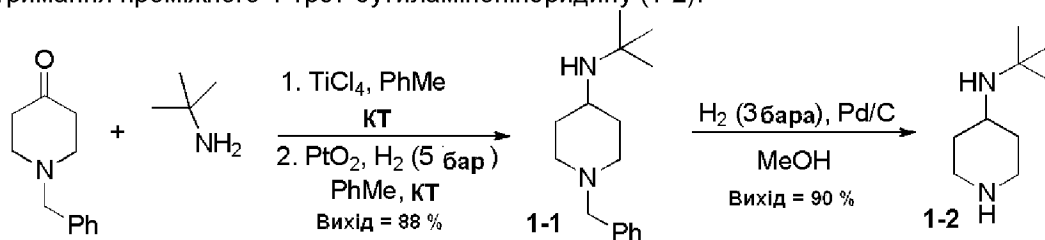
Спектри ЯМР реєстрували на Bruker Avance 300 Мгц. Аналітична ультрависокоєфективна рідинна хроматографія-мас-аналіз (UHPLC-MS): UPLC Waters Acquity, UV DAD, з'єднаний з тандемним квадрупольним мас-спектрометром Waters Quattro Premier XE.

Колонка Acquity UPLC BEH C18 ($2,1 \times 50$ мм) 1,7 мкм, рухома фаза: А $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ТФОК, В: $\text{MeCN} + 0,1\%$ ТФОК. Умови елювання включали лінійний градієнт (хвилина/% В): 0/5 % В, 4/98 % В, швидкість потоку 0,4 мл/хв.

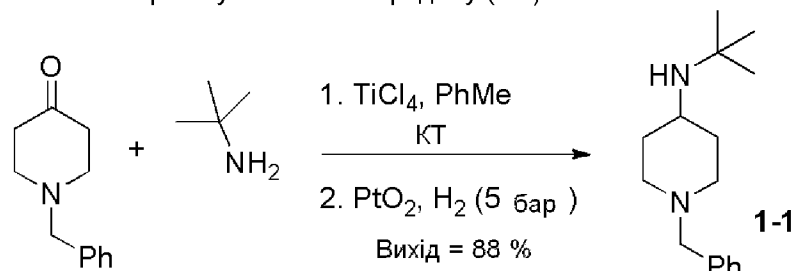
1. Приклад 1: Отримання гідрохлоридної солі 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (1-6).



Отримання проміжного 4-трет-бутиламінопіперидину (1-2):



1.1. Синтез 1-бензил-4-трет-бутиламінопіперидину (1-1)



5

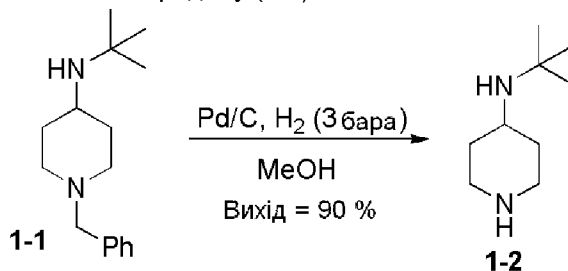
До розчину N-бензил-4-піперидиону (60,0 г, 314 ммоль) у 500 мл сухого толуолу і трет-бутиламіну (135 мл, 1280 ммоль) додавали по краплях при $T < 15^\circ\text{C}$ розчин тетрахлориду титану (23,0 мл, 210 ммоль) у 250 мл сухого толуолу. Отриману в результаті суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 20 год. і потім фільтрували через шар Целіту®. Толуольний

розчин переносили в реактор для гідрування під високим тиском і додавали двоокис платини (160 мг, 0,70 ммоль). Водень вводили в реактор при тиску 5 бар, і реакцію проводили при кімнатній температурі протягом 2 днів. Потім отриману в результаті суміш розбавляли 2 М водним розчином NaOH (400 мл) і фільтрували через шар Целіту®. Шари розділяли, і водний шар екстрагували толуолом. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням 68,05 г (вихід 88 %) оранжевого масла, яка відповідає 1-бензил-4-трет-бутиламінопіперидину.

Маса: (ES+) C₁₆H₂₆N₂ необхідно 246; знайдено 247 [M+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃)

1.2. Синтез 4-трет-бутиламінопіперидину (1-2)

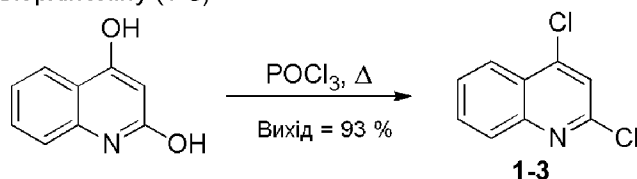


У водневому хімічному реакторі до дегазованого азотом розчину 1-бензил-4-трет-бутиламінопіперидину (68,05 г, 276 ммоль) у 700 мл метанолу додавали порошок паладію на вугіллі 10 % мас., вологість 50 % (29,40 г, 13,81 ммоль, 5 % мол.) в атмосфері азоту. Водень вводили в реактор при тиску 3 бари, і реакцію проводили за кімнатної температури протягом 2 днів. Потім отриману суміш фільтрували через шар Целіту®, і фільтрат концентрували при зниженому тиску з отриманням 38,86 г (вихід 90 %) жовтої твердої речовини, яка відповідає 4-трет-бутиламінопіперидину.

Маса: (ES+) C₉H₂₀N₂ необхідно 156; знайдено 157 [M+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃)

1.3. Синтез 2,4-дихлорхіноліну (1-3)

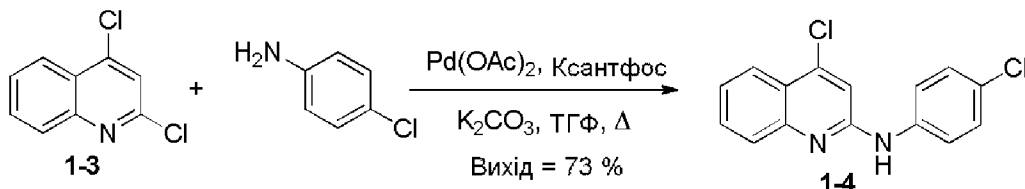


До хінолін-2,4-діолу (50,0 г, 310 ммоль) додавали по краплях фосфорилхлорид (250 мл, 2682 ммоль) при 0 °С. Отриману в результаті суміш перемішували і кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі. Потім суміш охолоджували, концентрували при зниженому тиску і двічі спільно упарювали з 500 мл толуолу. Залишок потім обробляли за допомогою ДХМ (500 мл) і промивали холодною водою. Водний шар екстрагували за допомогою ДХМ, і об'єднані органічні шари об'єднували і сушили над MgSO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням коричневої твердої речовини (57,0 г, вихід 93 %), яка відповідає 2,4-дихлорхіноліну.

Маса: (ES+) C₉H₅Cl₂N необхідно 197; знайдено 198 [M+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃)

1.4. Синтез 2-(4-хлорфеніламіно)-4-хлорхіноліну (1-4)



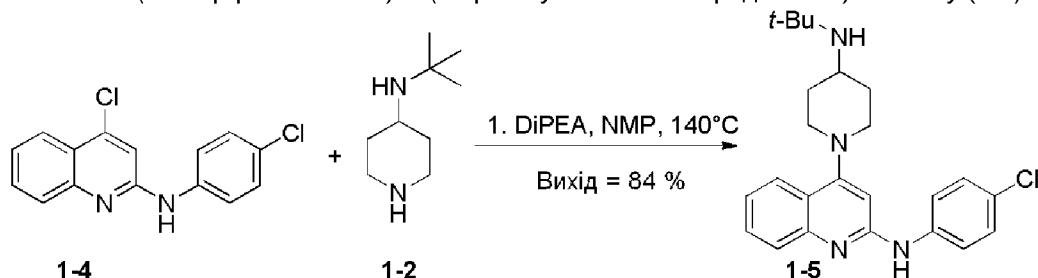
До розчину 2,4-дихлорхіноліну (2,00 г, 10,1 ммоль) у сухому ТГФ (20 мл) в атмосфері азоту додавали 4-хлоранілін (1,45 г, 11,1 ммоль) і K₂CO₃ (3,91 г, 28,3 ммоль). Отриману в результаті суміш дегазували 5 хв за допомогою азоту, потім додавали Ксантифос (590 мг, 1,01 ммоль) і Pd(OAc)₂ (120 мг, 0,5 ммоль), і реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2 годин. Реакційну суміш потім охолоджували до кімнатної температури і концентрували при зниженому тиску. Залишок розподіляли між водою і AcOEt, і водний шар екстрагували за допомогою AcOEt. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували

при зниженому тиску з одержанням жовтого масла. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/АсОЕт від 7/3 до 0/10) з отриманням 2,13 г (вихід 73 %) жовтої твердої речовини, яка відповідає 2-(4-хлорфеніламіно)-4-хлорхіноліну.

Маса: (ES+) $C_{15}H_{10}Cl_2N_2$, необхідно 288; знайдено 289 [M+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃)

1.5. Синтез 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (1-5)

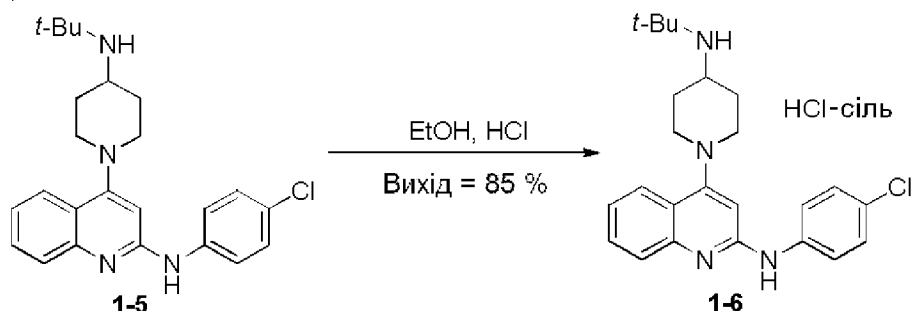


До розчину 2-(4-хлорфеніламіно)-4-хлорхіноліну (1,00 г, 3,46 ммоль) і 4-(трет-бутиламіно)піперидину (684 мг, 4,38 ммоль) у 5 мл NMP додавали N, N-діізопропілетиламін (0,947 мл, 5,47 ммоль), і суміш нагрівали протягом 24 год. при 140 °С. Потім реакційну суміш охолоджували, розбавляли 1 н водним розчином NaOH, і отриману в результаті суміш екстрагували за допомогою АсОЕт. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням коричневої рідини. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/АсОЕт від 8/2 до 2/8) з отриманням жовтуватої твердої речовини. Цю тверду речовину перекристалізовували з MeCN з отриманням 1,19 г (вихід 84 %) білої твердої речовини, яка відповідає 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

ВЕРХ-МС: $t_{\text{гp}}=1,24$ хв, (ES+) $C_{24}H_{29}ClN_4$ необхідно 408; знайдено 409 [M+H], 353 [M-tBu+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃)

1.6. Синтез гідрохлоридної солі 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (1-6)



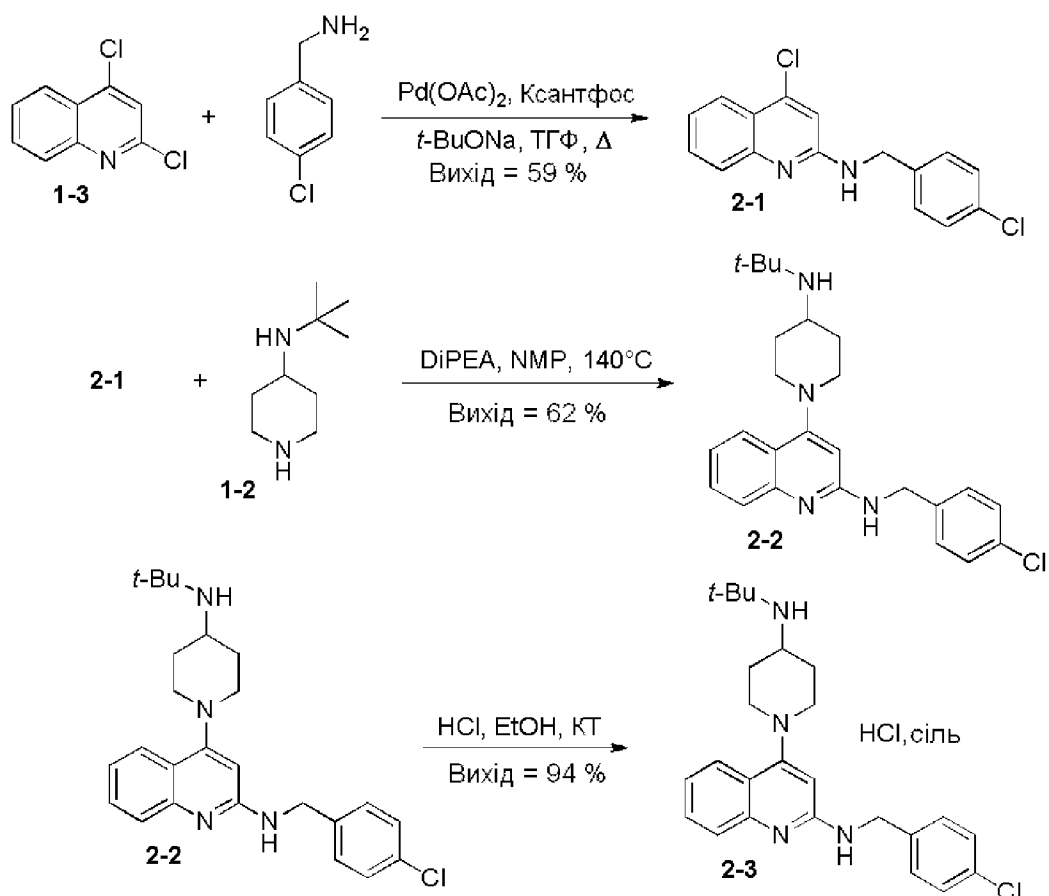
До суспензії 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (440 мг, 1,1 ммоль) у 4 мл EtOH додавали по краплях 371 мкл 7,25 М розчину HCl у EtOH. Тверда речовина розчинялася, і суміш перемішували протягом 20 хв за кімнатної температури. Потім отриманий у результаті розчин концентрували приблизно до половини об'єму при зниженому тиску і додавали 6 мл ефіру. Отриману суміш перемішували протягом 1 години за кімнатної температури, отримуючи білу тверду речовину, яку відфільтровували, промивали ефіром і сушили у вакуумі при 45 °С з отриманням 401 мг (вихід 85 %) білої твердої речовини, яка відповідає гідрохлоридній солі 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

ВЕРХ-МС: $t_{\text{гp}}=1,21$ хв, (ES+) $C_{24}H_{29}ClN_4$ необхідно 408; знайдено 409 [M+H], 353 [M-tBu+H]

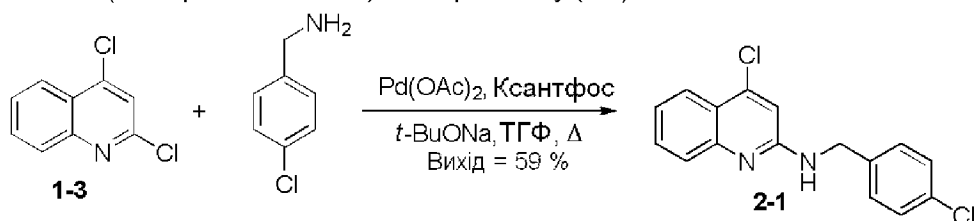
¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD)

¹³C ЯМР (75 МГц, CD₃OD)

2. Приклад 2. Отримання гідрохлоридної солі 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (2-3)



2.1. Синтез 2-(4-хлорбензиламіно)-4-хлорхіноліну (2-1)

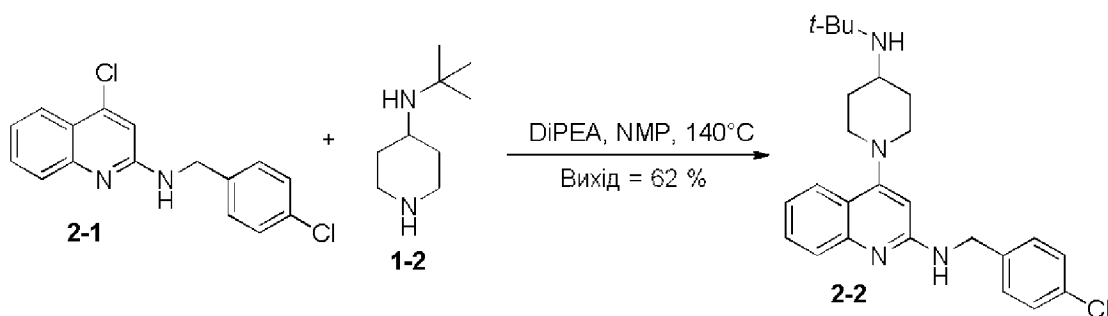


До розчину 2,4-дихлорхіноліну (1,00 г, 5,05 ммоль) у сухому ТГФ (10 мл) в атмосфері азоту додавали 4-хлорбензиламін (1,46 г, 10,1 ммоль) і $t\text{-BuONa}$ (1,36 г, 14,1 ммоль). Отриману в результаті суміш дегазували протягом 5 хв за допомогою азоту, потім додавали Ксантифос (295 мг, 0,51 ммоль) і $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (58 мг, 0,25 ммоль), і реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2 годин. Реакційну суміш потім охолоджували до кімнатної температури і концентрували при зниженому тиску. Залишок розподіляли між насиченим розчином солі і AcOEt , і водний шар екстрагували за допомогою AcOEt . Об'єднані органічні шари сушили над Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням коричневого масла. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/ДХМ від 5/5 до 0/10) з отриманням 897 мг (вихід 59 %) коричневої твердої речовини, яка відповідає 2-(4-хлорбензиламіно)-4-хлорхіноліну.

Мас-спектр: (ES^+) $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2$ необхідно 302; знайдено 303 $[\text{M}+\text{H}]$

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3)

2.2. Синтез 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (2-2)

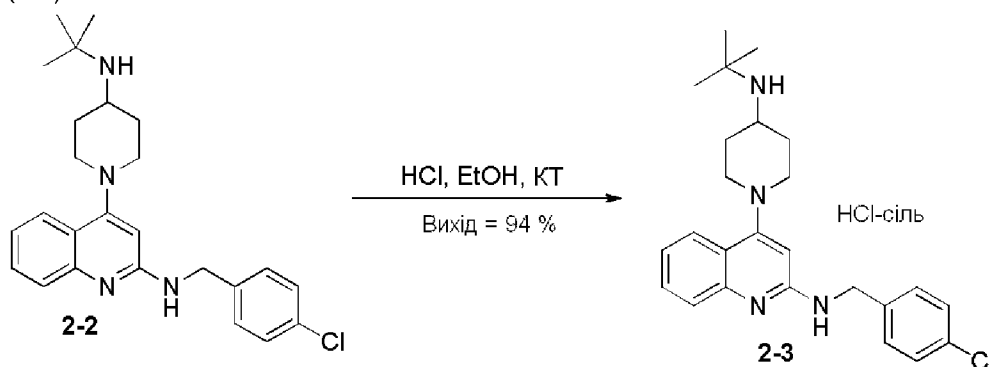


До розчину 2-(4-хлорбензиламіно)-4-хлорхіноліну (1,05 г, 3,46 ммоль) і 4-(трет-бутиламіно)-піперидину (0,684 г, 4,38 ммоль) у 5 мл NMP додавали N,N-діізопропілетиламін (0,947 мл, 5,47 ммоль), і суміш нагрівали протягом 22 год. при 140 °С. Потім реакційну суміш охолоджували, розбавляли 1 н водним розчином NaOH, і отриману в результаті суміш екстрагували за допомогою AcOEt. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням жовтого масла. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/AcOEt від 8/2 до 0/10) з отриманням жовтої твердої речовини. Цю тверду речовину перекристалізовували з MeCN з отриманням 904 мг (вихід 62 %) білої твердої речовини, яка відповідає 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

ВЕРХ-МС: $t_{\text{втр.}}=1,30$ хв, (ES+) $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{ClN}_4$ необхідно 422; знайдено 423 [M+H], 368 [M-tBu+H]

 ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3)

2.3. Синтез гідрохлоридної солі 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (2-3)

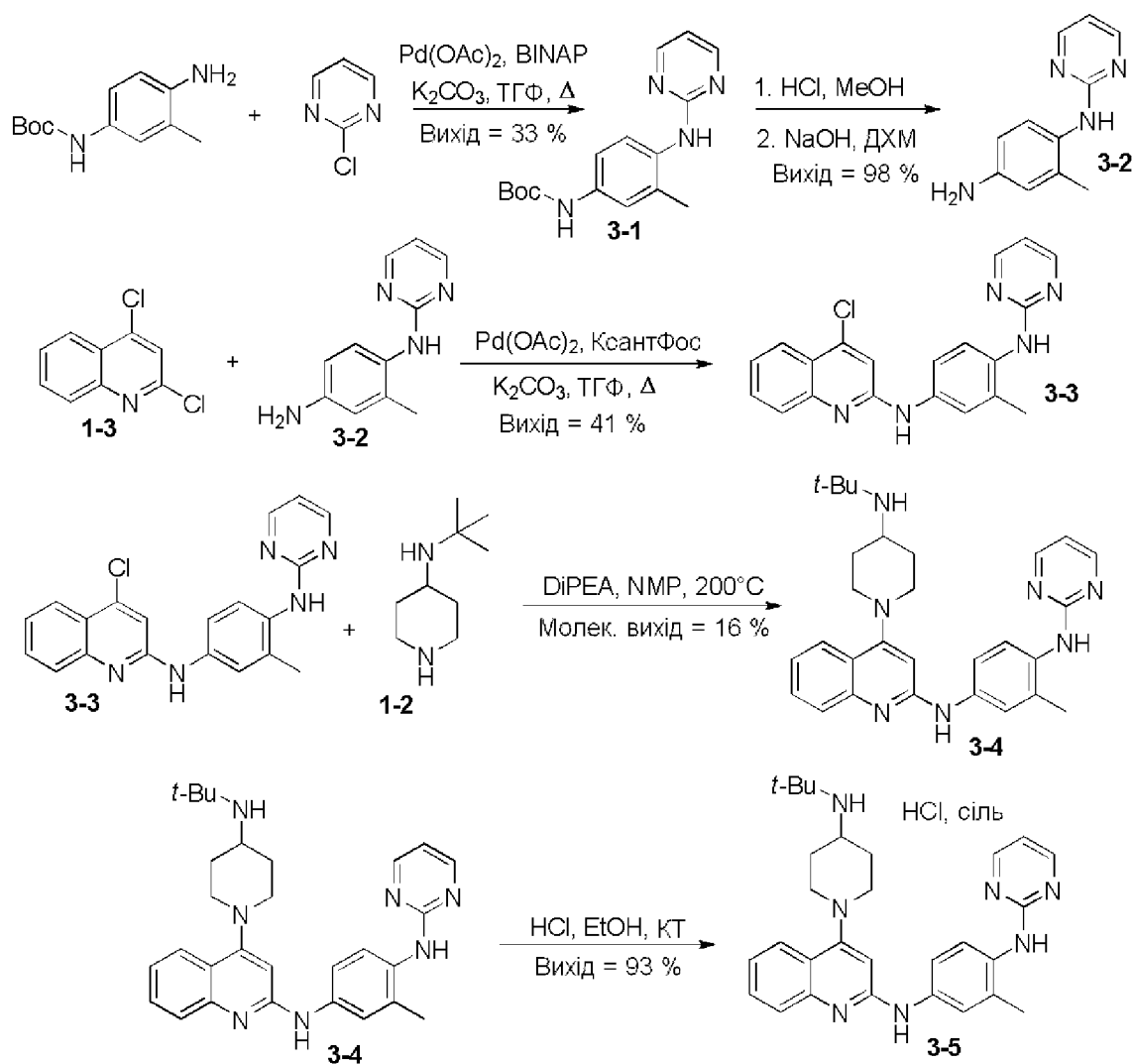


До суспензії 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (450 мг, 1,06 ммоль) у 2,5 мл EtOH додавали по краплях 400 мкл 7 М розчину HCl у EtOH. Тверда речовина розчинялася, і суміш перемішували протягом 3 год. за кімнатної температури. Потім отриманий розчин концентрували при зниженому тиску і додавали ефір. Отриману в результаті суміш перемішували і розтирали за кімнатної температури з отриманням жовтуватої твердої речовини, яку відфільтровували, промивали ефіром і сушили у вакуумі. Жовтувату тверду речовину розчиняли у чистій воді і потім ліофілізували з отриманням 401 мг (вихід 94 %) білої твердої речовини, яка відповідає гідрохлоридній солі 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

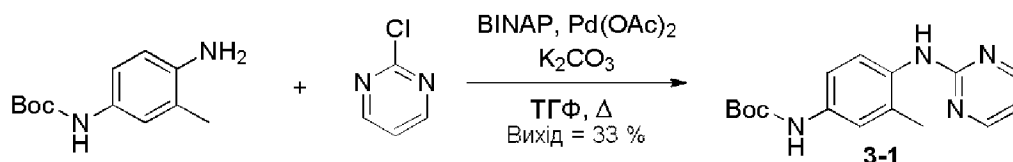
ВЕРХ-МС: $t_{\text{втр.}}=1,31$ хв, (ES+) $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{ClN}_4$ необхідно 422; знайдено 423 [M+H], 369 [M-tBu+H]

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆)

3. Приклад 3: Отримання гідрохлоридної солі 2-[3-метил-4-(піримідин-2-іламіно)феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (3-5)



3.1. Синтез 2-метил-N¹-(піримідин-2-іл)-N⁴-(трет-бутилоксикарбоніл)-бензол-1,4-діаміну (3-1)

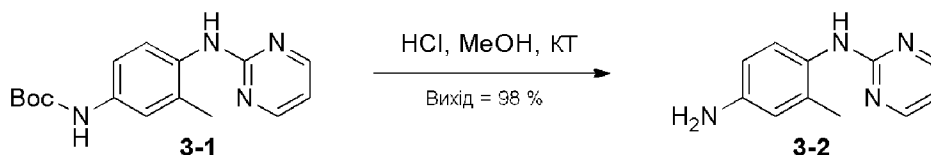


Розчин 2-метил-N⁴-(трет-бутилоксикарбоніл)-бензол-1,4-діаміну (2,40 г, 10,8 ммоль), 2-хлорпіримідину (0,78 г, 6,5 ммоль) і K₂CO₃ (2,24 г, 16,2 ммоль) у сухому ТГФ (48 мл) дегазували за допомогою азоту протягом 15 хвилин. Потім додавали Pd(OAc)₂ (58 мг, 0,26 ммоль) і ліганд BINAP (320 мг, 0,52 ммоль), і реакційну суміш вдруге дегазували протягом 20 хвилин. Після завершення реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 1 години. Реакційну суміш потім охолоджували до кімнатної температури і концентрували при зниженому тиску. Залишок розподіляли між водою і AcOEt, і водний шар екстрагували за допомогою AcOEt. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/AcOEt від 10/0 до 7/3) з отриманням 650 мг (вихід 33 %) коричневої твердої речовини, яка відповідає 2-метил-N¹-(піримідин-2-іл)-N⁴-(трет-бутилоксикарбоніл)-бензол-1,4-діаміну.

ВЕРХ-МС: t_{гp.} = 2,06 хв, (ES⁺) C₁₆H₂₀N₄O₂ необхідно 300; знайдено 301 [M+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD)

3.2. Синтез 2-метил-N¹-(піримідин-2-іл)-бензол-1,4-діаміну (3-2)

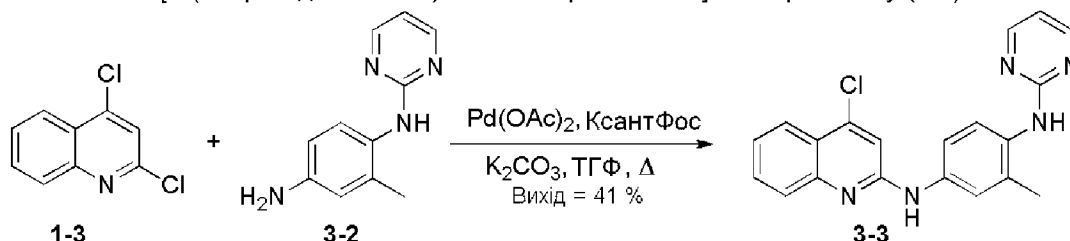


До 2-метил-N¹-(піримідин-2-іл)-N⁴-(трет-бутилоксикарбоніл)-бензол-1,4-діаміну (1,18 г, 3,93 ммоль) додавали по краплях за кімнатної температури розчин 3 М НСl у метанолі (15 мл). Потім реакційну суміш перемішували протягом 1 години за кімнатної температури. Реакційну суміш потім концентрували при зниженому тиску, і залишок розподіляли між ДХМ і 1 М водним розчином NaOH, і водний шар екстрагували за допомогою ДХМ. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням 787 мг (вихід 98 %) жовтого масла, яка відповідає 2-метил-N¹-(піримідин-2-іл)бензол-1,4-діаміну.

Маса: (ES⁺) C₁₁H₁₂N₄ необхідно 200; знайдено 201 [M+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD)

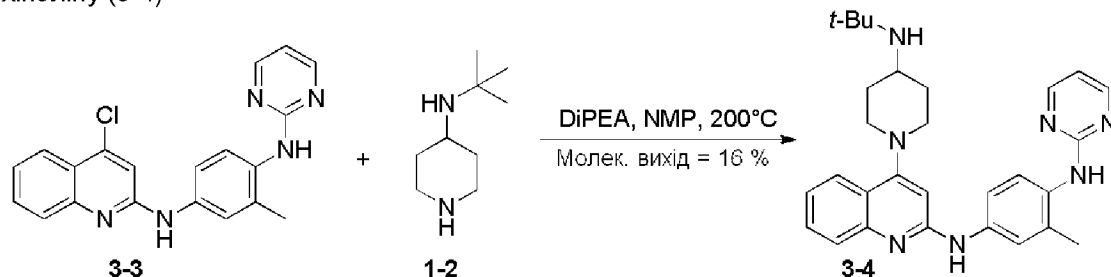
3.3. Синтез 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-хлорхіноліну (3-3)



Розчин 2-метил-N¹-(піримідин-2-іл)бензол-1,4-діаміну (771 мг, 3,85 ммоль), 2,4-дихлорхіноліну (693 мг, 3,5 ммоль) і K₂CO₃ (1,35 г, 6 ммоль) у сухому ТГФ (7 мл) дегазували за допомогою азоту протягом 20 хвилин. Потім додавали Pd(OAc)₂ (47 мг, 0,21 ммоль) і ліганд КсантФос (61 мг, 0,10 ммоль), і реакційну суміш вдруге дегазували протягом 20 хвилин. Після завершення реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 4 годин. Реакційну суміш потім охолоджували до кімнатної температури і концентрували при зниженому тиску. Залишок розподіляли між водою і AcOEt, і водний шар екстрагували за допомогою AcOEt. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/AcOEt від 10/0 до 5/5) з отриманням 520 мг (вихід 41 %) жовтої твердої речовини, яка відповідає 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-хлорхіноліну.

Маса: (ES⁺) C₂₀H₁₆ClN₅ необхідно 361; знайдено 362 [M+H]

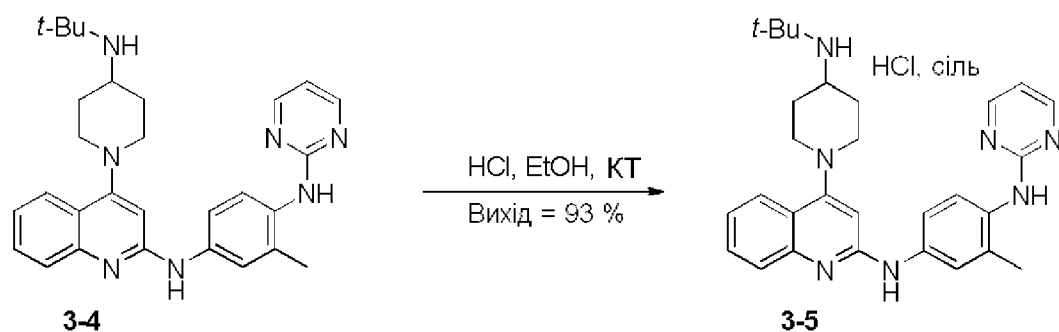
3.4. Синтез 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (3-4)



До розчину 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-хлорхіноліну (350 мг, 0,97 ммоль) у NMP (1,5 мл) додавали 4-трет-бутиламінопіперидин (760 мг, 4,80 ммоль). Отриманий розчин нагрівали протягом 30 хвилин при 200 °C у лабораторній мікрохвильовій печі. Потім отриману в результаті суміш охолоджували і розподіляли між водою і AcOEt, і водний шар екстрагували за допомогою AcOEt. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/AcOEt від 10/0 до 5/5) з отриманням 75 мг (вихід 16 %) коричневої твердої речовини, яка відповідає 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

ВЕРХ-МС: t_{упр}=1,15 хв, (ES⁺) C₂₉H₃₅N₇, необхідно 481; знайдено 482 [M+H], 426 [M-tBu+H]

3.5. Синтез гідрохлоридної солі 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (3-5)

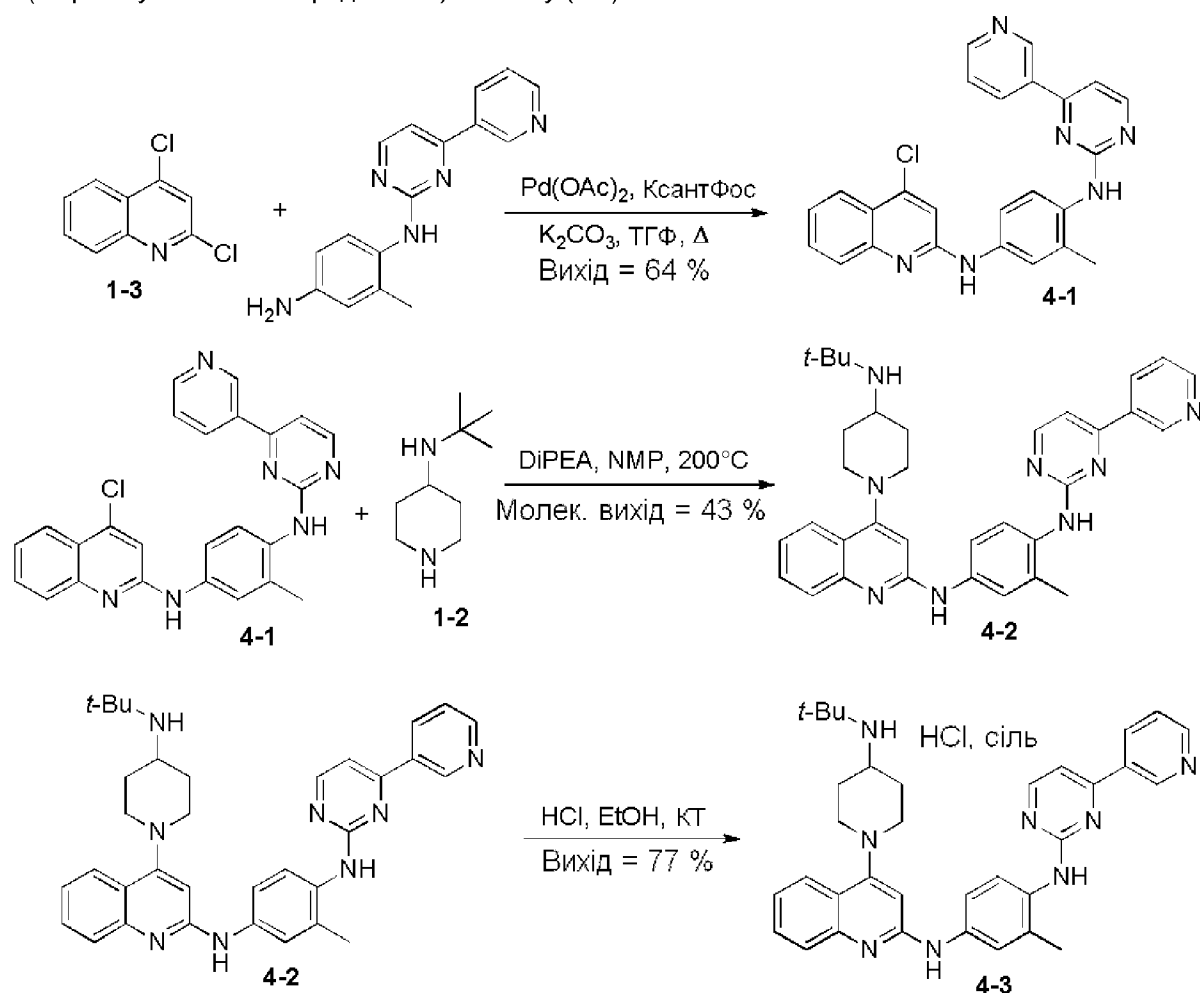


3,0 М розчин HCl у EtOH (290 мкл) додавали по краплях до 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (75 мг, 0,16 ммоль). Отриману в результаті суміш фільтрували й упарювали при зниженому тиску з отриманням 80 мг (вихід 93 %) жовтуватої твердої речовини, яка відповідає гідрохлоридній солі 2-[4-(2-піримідиніламіно)-3-метил-феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

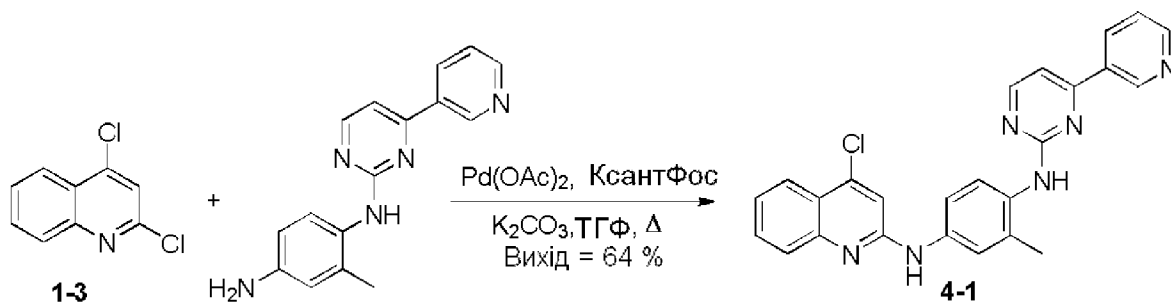
ВЕРХ-МС: $t_{\text{гпр}}=1,15$ хв, (ES+) $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_7$, необхідно 481; знайдено 482 [M+H], 426 [M-tBu+H]

^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD +декілька крапель DMSO-d_6)

4. Приклад 4. Отримання гідрохлоридної солі 2-[3-метил-4-(піримідин-2-іламіно)феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (4-3)



4.1. Синтез 2-[4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно]-4-хлорхіноліну (4-1)

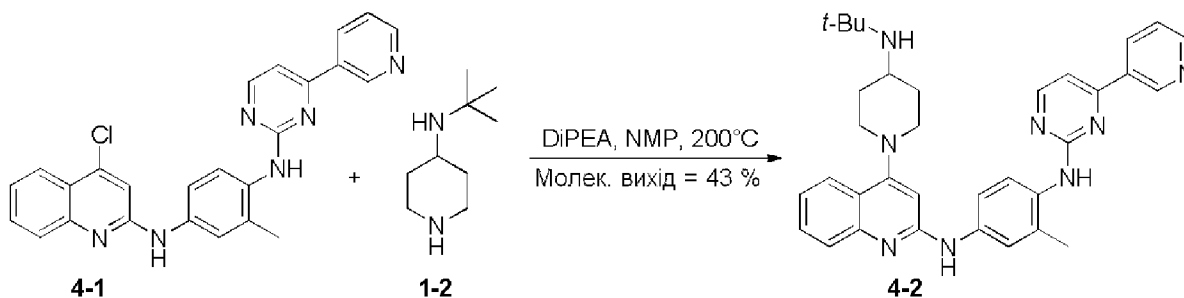


До розчину 2-метил-N¹-[4-(піридин-3-іл)-піримідин-2-іл]бензол-1,4-діаміну (1,18 г, 4,26 ммоль), 2,4-дихлорхіноліну (767 мг, 3,87 ммоль) у сухому ТГФ (11,9 мл) додавали K₂CO₃ (2,7 г, 19,0 ммоль), і реакційну суміш дегазували за допомогою азоту протягом 15 хвилин. Потім додавали ліганд Ксантифос (226 мг, 0,387 ммоль) і Pd(OAc)₂ (44 мг, 0,19 ммоль), і реакційну суміш вдруге дегазували протягом 15 хвилин. Після завершення реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі. Реакційну суміш потім охолоджували до кімнатної температури і концентрували при зниженому тиску. Залишок розподіляли між водою і AcOEt, і водний шар екстрагували за допомогою AcOEt. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт циклогексан/AcOEt від 10/0 до 0/10) з отриманням 1,08 г (вихід 64 %) коричневої твердої речовини, яка відповідає 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-хлорхіноліну.

Маса: (ES⁺) C₂₅H₁₉ClN₆ необхідно 438; знайдено 439 [M+H]

¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD)

4.2. Синтез 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (4-2)

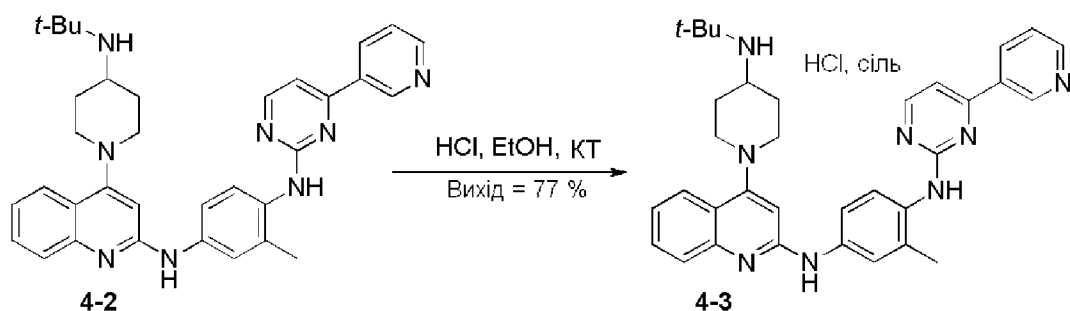


До розчину 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-хлорхіноліну (1,0 г, 2,28 ммоль) у NMP (10 мл) додавали 4-трет-бутиламінопіперидин (1,8 г, 11,0 ммоль). Отриманий розчин нагрівали протягом 90 хвилин при 200 °C в лабораторній мікрохвильовій печі. Отриману в результаті суміш розподіляли між водою і AcOEt, і водний шар екстрагували за допомогою AcOEt. Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Сирий продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії (від AcOEt/ДХМ 3/2, потім ДХМ/MeOH 9/1), отримуючи 1,01 г жовтої твердої речовини, яку перекристалізовували з EtOH з отриманням 550 мг (вихід 43 %) білої твердої речовини, яка відповідає 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

ВЕРХ-МС: t_{упр.} = 1,20 хв, (ES⁺) C₃₄H₃₈N₈ необхідно 558; знайдено 559 [M+H], 503 [M-tBu+H]

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆)

4.3. Синтез гідрохлоридної солі 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (4-3)



До суспензії 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну в EtOH 5,5 мл додавали по краплях 3,0 М розчин HCl у EtOH (4 мл). Утворену жовту тверду речовину відфільтровували і потім розтирали з циклогексаном. Суспензію відфільтровували з отриманням 505 мг (вихід 77 %) білої твердої речовини, яка відповідає гідрохлоридній солі 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метил-феніламіно}-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну.

ВЕРХ-МС: $t_{\text{гпр}} = 1,22$ хв, (ES+) $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_8$ необхідно 558; знайдено 559 [M+H], 503 [M-tBu+H]

^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD +декілька крапель DMSO-d_6) ^{13}C ЯМР (125 МГц, CD_3OD)

5. Приклад 5: Профіль активності сполук 1-6, 2-3, 3-5 і 4-3 у клітинних лініях MOLM-14, KG-1, MV4-11, A375, HCT-116, HepG2, Huh-7, MRC-5, MDA-MB-231, ARPE-19 і клітинах PBMC

Клітинна культура: Усі клітинні лінії підтримували в середовищі, яке містить 1 % пеніциліну-стрептоміцину (Dutscher, P06-07100) і 10 % фетальної бичачої сироватки (Gibco, W3387L), за винятком 20 % для клітинної лінії KG-1 і PBMC, і культивували при 37 °C з 5 % CO_2 .

Клітинні лінії HepG2, Huh7, HCT-116, MDA-MB-231 і A375 культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (Dutscher, L0103).

Клітинні лінії KG-1 і MV4-11 підтримували в модифікованому пошуковому середовищі Дульбекко (Dutscher, L0190).

Клітинну лінію MOLM-14 підтримували в середовищі альфа-MEM (Gibco, 22561-021).

PBMC підтримували в середовищі RPMI 1640 (Dutscher, L0498).

Клітинну лінію MRC-5 підтримували в MEM (Dutscher, L0416).

Клітинну лінію ARPE-19 культивували в середовищі DMEM:F12 (Dutscher, L0093).

Аналіз життєздатності клітин: Життєздатність клітин вимірювали за допомогою люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo®, як описано виробником (Promega, Ref G7571), з використанням люмінометра Infinite F200Pro (Tecan). Коротко, для адгезивних клітин клітини висівали на 96-ямкові планшети (білі з прозорим дном) у 90 мкл середовища на ямку і їм дозволяли рости протягом ночі перед аналізом. Для клітин, які ростуть у суспензії, клітини висівали на 96-ямкові планшети безпосередньо перед аналізом. Кількість клітин, посіяних на ямку, зазначено в нижченаведеній таблиці 1:

Таблица 1

Кількість клітин, посіяних на ямку для аналізу життєздатності клітин

Пункт	Клітинні лінії	Кількість клітин на ямку
1	HCT-116	2000
2	A375	800
3	Huh7	10000
4	HepG2	7500
5	MOLM-14	10000
6	KG-1	20000
7	MV4-11	20000
8	PBMC	10000
9	MRC-5	5000
10	ARPE-19	5000
11	MDA-MB-231	10000

Сполуки додавали в різних концентраціях у кожен ямку і культури клітин інкубували протягом 72 годин. Розчинник (H_2O) використовували як контроль, і всі сполуки випробовували при постійному процентному вмісті H_2O . Після додавання 100 мкл CellTiter-Glo® люмінесценцію

вимірювали з використанням Infinite F200Pro (Tecan). Величини EC_{50} визначали як дозу сполуки, необхідну для зниження значень люмінесценції до 50 % сигналу, отриманого для необроблених клітинних культур. Експериментальні дані аналізували з використанням комп'ютерної програми Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Каліфорнія).

5 Всі експерименти проводили, як мінімум, у двох повторностях і повторювали незалежно два рази.

Таблиця 2

Аналіз клітинної лінії MOLM-14 на інгібування росту в присутності сполук 1-6, 2-3, 3-5, 4-3

Сполуки Концентрації	Життєздатність клітин клітинної лінії MOLM-14, %	
	10 мкМ	4 мкМ
1-6	12,1	71,8
2-3	0,3	31,8
3-5	8,7	78,7
4-3	0,2	0,5

Таблиця 3

Аналіз клітинних ліній MOLM-14, KG-1, MV4-11 і PBMC по інгібуванню росту в присутності сполуки 2-3

Клітини	MOLM-14	KG-1	MV4-11	PBMC
Якісна характеристика	Гостра мієлоїдна лейкемія	Гостра мієлогенна лейкемія	В-біфенотипічна мієломоноцитарна лейкемія	Мононуклеарні клітини периферичної крові
	Гетерозиготна по FLT3-ITD +/-	FLT3-ITD WT -/- злиття FGFR1	Гомозиготна по FLT3-ITD +/+	
EC_{50} (мкМ)	2,2	5,1	2,3	1,9

Таблиця 4

Аналіз клітинних ліній A375, HCT-116, HepG2 і Huh-7 на інгібування росту в присутності сполуки 2-3

Клітинні лінії	A375	HCT-116	HepG2	Huh-7
Якісна характеристика	Злоякісна меланома	Колоректальна карцинома	Гепатоцелюлярна карцинома	Гепатоцелюлярна карцинома
EC_{50} (мкМ)	1,0	1,6	0,9	1,7

10

Таблиця 5

Аналіз клітинних ліній MRC-5, MDA-MB-231 і ARPE-19 на інгібування росту в присутності сполуки 2-3

Клітинні лінії	MRC-5	MDA-MB-231	ARPE-19
Якісна характеристика	Людський фетальний фібропласт легені	Аденокарцинома грудей	Людський ретинальний пігментний епітелій
EC_{50} (мкМ)	≈3,4	2,0	≈6,9

Таблиця 6

Аналіз клітинних ліній MOLM-14, A375, HCT-116 і HepG2 на інгібування росту в присутності сполуки 4-3

Клітинні лінії	MOLM-14	A375	HCT-116	HepG2
Якісна характеристика	Гостра мієлоїдна лейкемія	Злоякісна меланома	Колоректальна карцинома	Гепатоцелюлярна карцинома
EC ₅₀ (мкМ)	2,3	1,4	1,8	6,3

6. Приклад 6: Аналіз компартменту з ALDH+ у клітинній лінії MOLM-14

Клітинну лінію MOLM-14 культивували в середовищі альфа-MEM з додаванням 10 % об./об. фетальної бичачої сироватки, 1 % пеніциліну-стрептоміцину і підтримували при 37 °C з 5 % CO₂. 10000 клітин висівали на 96-ямкові планшети безпосередньо перед аналізом.

Кожну сполуку додавали в різних концентраціях (комбінації шести концентрацій) у кожен ямку, і культури клітин інкубували протягом 72 годин. Розчинник (H₂O) використовували як контроль, і всі сполуки випробовували при постійному процентному вмісті розчинника. Клітинне наростання вимірювали з використанням люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo®, як описано виробником (Promega, Ref G7571 Медісон, Вісконсин, США) з використанням планшет-рідера Centro (Berthold, Франція).

У кожному експерименті кожна точка являє собою середнє із трьох повторностей у культурі клітин.

Експериментальні дані аналізували з використанням комп'ютерної програми Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Каліфорнія), і значення EC₅₀ визначали як дозу сполуки, необхідну для зниження значень оптичної густини до 50 % сигналу, отриманого для клітинних культур, оброблених розчинником.

Аналіз компартменту з альдегіддегідрогеназою (ALDH) і високий рівень альдегіддегідрогеназної активності (ALDH+) використовували для виявлення популяцій пухлино-ініціювальних клітин (ракових стовбурових клітин, CSC). Набір для аналізу Aldefluor™ (StemCell Technologies, 01700) дозволив оцінити активність лікарських засобів на CSC-клітинах, наприклад, у популяції клітинної лінії гострої мієлоїдної лейкемії MOLM-14 (посилання: Storms, R. W., Trujillo, A. P., Springer, J. B., Shah, L., Colvin, O. M., Ludeman, S. M., & Smith, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96 (16), 9118-9123). Набір для аналізу Aldefluor™ використовували згідно з процедурою, описаною виготовлювачем. Коротко, клітинну лінію MOLM-14 культивували в середовищі альфа-MEM з додаванням 10 % об./об. фетальної бичачої сироватки, 1 % пеніциліну-стрептоміцину і підтримували при 37 °C з 5 % CO₂. У даному аналізі використовували 5×10⁵ клітин. Кожну сполуку додавали в різних концентраціях (див. таблицю 8), і культури клітин інкубували протягом 72 годин. Розчинник (H₂O) використовували як контроль, і всі сполуки випробовували при постійному процентному вмісті розчинника. Клітини, отримані з клітинної культури, інкубували протягом 45 хвилин при 37 °C з буфером для аналізу Aldefluor™, який містить Bodipy™-аміноацетальдегід, флуоресцентний альдегідний субстрат ALDH. ALDH перетворює флуоресцентний субстрат BAAA у Bodipy™-аміноацетову кислоту (BAA), яка зберігається в клітині. Інгібітор активного ефлюксу є присутнім у буфері для аналізу Aldefluor™, щоб уникнути активного ефлюксу з клітини продукту субстрату ALDH-залежної перетвореної BAA. Флуоресцентний сигнал прямо пропорційний активності ALDH у клітинах і вимірюється проточною цитометрією. Негативний контроль використовують для вимірювання рівня фонові флуоресценції. З цією метою як селективний інгібітор ALDH використовували 4-(N, N-діетиламіно)-бензальдегід (DEAB). Розрахунок життєздатності клітин здійснювали, використовуючи набір LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). Експериментальні дані аналізували з використанням комп'ютерної програми Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Каліфорнія), і значення EC₅₀ визначали як дозу сполуки, необхідну для зниження значень оптичної густини до 50 % сигналу, отриманого для клітинних культур, оброблених розчинником.

Таблиця 7

Аналіз клітинної лінії MOLM-14 на інгібування росту в присутності цитарабіну і сполуки 2-3

Сполуки	Цитарабін	2-3 ^a
EC ₅₀ (мкМ)	0,290	2,2

^a: EC₅₀ отримували способом, описаним у прикладі 5, див. таблицю 3

Таблиця 8

Популяція ALDH зменшується в клітинній лінії MOLM-14 за допомогою сполуки 2-3, використовуючи набір для аналізу Aldefluor™

Сполуки	Контроль	Цитарабін		2-3		
		1 мкМ	3 мкМ	2,5 мкМ	5,0 мкМ	7,5 мкМ
ALdefluor™-позитивні CSC (%)	100	130	116	100	80	20

7. Приклад 7: Аналіз клітинної лінії Нер3В-Лус на інгібування росту (EC₅₀, мкМ) у присутності сполуки 2-3

Перед обробкою сполукою сполуку розчиняли в H₂O, щоб одержати 10 мМ маточний розчин. Потім одержували робочі розчини (кратні 5 кінцеві концентрації) з використанням середовища MEM (Gibco, 1128319), яке містить 10 % фетальної бичачої сироватки (Gibco, 10099141).

При проведенні аналізу як внутрішнього контролю для кожного аналітичного планшета для аналізу використовували перевірку залежності доза-відповідь доксорубіцину на лінії клітин BEL-7402 (людська первинна гепатоцелюлярна карцинома). Середовище MEM, доповнену 5 % H₂O (5×), додавали в клітини як негативний контроль. Кінцева концентрація H₂O складала 1 % у кожній ямці.

Клітинну лінію Нер3В-Лус (клітинна лінія карциноми печінки людини, трансфікована люциферазою, для моделі ортотопічної пухлини) культивували в середовищі MEM, доповненому 10 % об./об. фетальною бичачою сироваткою (FBS), 1 % пеніциліну-стрептоміцину і підтримували при 37 °C з 5 % CO₂. 800 клітин висівали на 384-ямковий білий планшет із плоским прозорим дном (Corning, 3707).

Аналітична методика: Клітини в логарифмічній фазі росту збирали і підраховували. Клітинні суспензії додають у кожну ямку 384-ямкового планшета з розрахунку 800 клітин на ямку (загальний об'єм 40 мкл). Крайні ямки заповнюють буфером PBS. Випробовувану сполуку в різних концентраціях додають у двох повторностях (додають у планшет 10 мкл 5× розчинів сполук). Планшет інкубували протягом 72 годин в інкубаторі з 37 °C / 5 % CO₂. Життєздатність клітин вимірювали за допомогою люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo®, як описано виробником (Promega, Ref G7571). Після додавання 100 мкл реакційного розчину CellTiter-Glo®, люмінесценцію вимірювали з використанням люмінометра PHERAstar Plus. Дані реєстрували PHERAstar Plus, збір даних і аналіз виконували з використанням програми Microsoft Excel і програмного забезпечення GraphPad Prism v.6.

Таблиця 9

Дослідження клітинної лінії Нер3В-Лус на інгібування росту в присутності сполуки 2-3

Сполуки	Доксорубіцин	2-3
Клітинні лінії	BEL-7402	Нер3В-Лус
EC ₅₀ (мкМ)	0,15	1,1

8. Приклад 8: Аналіз клітинних ліній САКІ-1 і 786-О на інгібування росту (EC₅₀, мкМ) у присутності сполуки 2-3

Клітинна культура: Клітинні лінії САКІ-1 і 786-О підтримували в середовищі RPMI 1640 (Dutscher, L0498), яке містить 1 % пеніциліну-стрептоміцину (Dutscher, P06-07100) і 10 % фетальної бичачої сироватки (Gibco, W3387L) і культивували при 37 °C з 5 % CO₂.

Вимірювання життєздатності клітин: Життєздатність клітин вимірювали за допомогою

люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo®, як описано виробником (Promega, Ref G7571), з використанням люмінометра Infinite F200Pro (Tecan). Коротко, клітини висівали на 96-ямкові планшети (білі з прозорим дном) у 90 мкл середовища на ямку і дозволяли рости протягом ночі перед аналізом. Кількість клітин, посіяних на ямку, зазначено в таблиці нижче:

5

Таблиця 10

Кількість посіяних клітин на ямку для аналізів життєздатності клітин CAKI-1 і 786-O

	Кількість клітин на ямку
CAKI-1	2250
786-O	1250

У кожен ямку додавали сполуку 2-3 і дві референсні сполуки (Сорафеніб і Сунітиніб) у різних концентраціях, і клітинні культури інкубували протягом 72 годин. Для аналізу сполуки 2-3 використовували H₂O як негативний контроль (= необроблені), і всі концентрації випробовували при постійному процентному вмісті H₂O. Для аналізу Сорафеніб і Сунітиніб використовували ДМСО як негативний контроль (= необроблені), і всі концентрації випробовували при постійному процентному вмісті ДМСО. Через 72 год. після інкубації сполук у кожен ямку додавали 100 мкл CellTiter-Glo® і вимірювали люмінесценцію з використанням Infinite F200Pro (Tecan). Величини EC₅₀ визначали як дозу сполуки, необхідну для зниження значень люмінесценції до 50 % сигналу, отриманого для необроблених клітинних культур. Експериментальні дані аналізували з використанням комп'ютерної програми Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Каліфорнія). Всі експерименти проводили щонайменше у трьох повторностях і повторювали незалежно щонайменше три рази.

10

15

Таблиця 11

Аналіз клітинної лінії CAKI-1 на інгібування росту
в присутності сполуки 2-3 і Сорафеніб, Сунітиніб як контролю

Сполуки	EC ₅₀ (мкМ)	Стандартне відхилення
2-3	1,4	0,1
Сорафеніб	4,5	1,5
Сунітиніб	1,7	0,7

20

Таблиця 12

Аналіз клітинної лінії 786-O на інгібування росту
в присутності сполуки 2-3 і Сорафеніб, Сунітиніб як контролю

Сполука	EC ₅₀ (мкМ)	Стандартне відхилення
2-3	2,1	0,2
Сорафеніб	6,8	1,7
Сунітиніб	6,0	1,1

9. Приклад 9: Дія in vitro сполуки 2-3 на клітини метастазуючого в печінку раку товстої кишки і субпопуляцію стовбурових клітин раку товстої кишки

Мета даного дослідження полягала в тому, щоб оцінити in vitro цитотоксичну активність сполуки 2-3 проти клітин, отриманих від пацієнтів з метастазуючим у печінку раком товстої кишки, свіжовиділених від пацієнтів, і більш конкретно на субпопуляцію CSC. В даний час є небагато способів для відстеження CSC in vitro. Наприклад, активність альдегіддегідрогенази (ALDH) може бути використана як маркер для ідентифікації ракових стовбурових клітин людини при раку товстої кишки. Крім того, CSC може бути збагачений культивуванням клітин у суспензії в безсироватковому середовищі, доповненому факторами росту. У таких умовах тільки CSC виростили у вигляді багатоклітинних тривимірних клонів, які називаються "пухлинними сферами". Скориставшись здатністю до утворення пухлинних сфер, ми можемо потім оцінити кількість CSC у зразку і, таким чином, оцінити вплив зазначеної молекули на здатність CSC самовідновлюватися.

35

Культура пухлинних клітин, отримана від пацієнтів

Отримані від пацієнтів клітини метастазів печінки (CPP19, 30, 36 і CPP45 - див. таблицю 1 для клінічних описів) підтримували в повній DMEM (Gibco) з 10 % FBS. Клітини отримували з біопсій, наданих CHU-Carémeau (Нім, Франція) у рамках затвердженого протоколу. Підписані інформовані згоди отримували від пацієнтів до отримання зразків відповідно до усіх етичних і правових аспектів. Пухлини промивали, подрібнювали на фрагменти (<2 мм³) і розщеплювали за допомогою лібази Н (0,26 од./мл, Roche), ресуспендованої у Accutax (Sigma-Aldrich). Через 2 години при 37 °С суспензію клітин фільтрували через сито 40 мкм для отримання суспензії окремих клітин і висівали в середовище DMEM, доповнене FBS, глутаміном, антибіотиками і несуттєвими амінокислотами. При утворенні моношару пухлинних клітин, отриманих від пацієнта, клітини відокремлювали з використанням трипсину/ЕДТА і ресуспендували в DMEM з 10 % FBS (для адгезивних клітин) або середовищі M11 визначеного складу (для утворення сфер). Клітини культивували у зволоженій атмосфері при 37 °С і 5 % CO₂.

Аналізи токсичності in vitro

Клітини висівали з розрахунку 10⁴ клітин на ямку в P96-ямкові планшети в DMEM з 10 % FBS. Через 24 години клітини обробляли сполукою 2-3, і життєздатність клітин оцінювали через 72 г після обробки люмінесцентним аналізом життєздатності клітин CellTiter-Glo® (Promega). EC₅₀ розраховували з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism v6 (Graphpad Software, Inc Ла-Хойя, Каліфорнія).

Аналіз Aldefluor™ і сортування клітин, активованих флуоресценцією (FACS)

Аналіз Aldefluor™ (Stem Cell Technologies, 01700) проводили згідно з інструкціями виробника (Stem Cell Technologies). ALDH^{ПОЗИТИВНІ}-клітини ідентифікували шляхом порівняння того ж зразка в присутності або під час відсутності інгібітору ALDH, діетиламінобензальдегіду (DEAB). FACS-гейтування активності ALDH установлювали на рівні 0,1 % в присутності DEAB. Клітини аналізували з використанням MacsQuant, і аналізували дані з використанням програмного забезпечення Cyflogic. Клітини CPP36 не використовували в цих аналізах через їхній високий профіль клітинної автофлуоресценції.

Аналізи утворення сфер

Оцінку клітин, що утворюють сфери, визначали після висівання 500 клітин/200 мкл на ямку в середовищі M11 у P96-ямкові планшети з ультранизьким зв'язуванням (Corning). M11 являє собою середовище DMEM/F12 (1:1) (Gibco), доповнене N2, глутаміном 3 мМ, глюкозою 0,6 %, інсуліном 4 мкг/мл (Sigma-Aldrich), hBasic-FGF 10 нг/мл (R&D Systems) і hEGF 20 нг/мл (R&D Systems). Розміри сфер, які перевищують 50 мкм, підраховували через 10 днів і представляли у вигляді кількості сфер на ділянку зображення. Клітини CPP45 не використовували в цих аналізах через їхню нездатність утворювати пухлинні сфери.

Статистичний аналіз

Для кожного експерименту дані представлені у вигляді середнього значення S.E.M трьох незалежних експериментів. Програмне забезпечення GraphPad Prism v6 (Graphpad Software, Inc Ла-Хойя, Каліфорнія) використовували для аналізу даних, тобто для параметричних t-критеріїв Стьюдента.

Таблиця 13

Клінічні характеристики пацієнта з раком товстої кишки

	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
Статева приналежність	М	М	М	М
Вік	65	69	81	80
Мутація	KRAS	Відсутня	KRAS	KRAS
Класифікація по TNM	T3N2aM1	TxNxM1	T4N2bM1	T3N1cM1
Радіотерапія	Відсутня	Відсутня	Відсутня	Відсутня
Хіміотерапія	Бевацизумаб, Фолфірі	Бевацизумаб Фолфокс, Фолфірі Кселокс	Бевацизумаб і Фолфірі	Відсутня

Оцінка in vitro цитотоксичності сполуки 2-3 на клітини, отримані від пацієнтів з метастазуючим у печінку колоректальним раком (CRC)

Люмінесцентний аналіз життєздатності клітин CellTiter-Glo®, як описано виробником

(Promega, Ref G7571), використовували для визначення цитотоксичності сполуки 2-3 у клітинах, отриманих від пацієнтів з метастазуючим у печінку CRC. Життєздатність клітин від необроблених контрольних клітин встановлена на рівні 100 %. Клітини спочатку вміщували при щільності 10000 клітин/100 мкл на ямку в P96-ямкові планшети і інкубували в зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °C протягом 24 годин. Клітини потім інкубували з розчинником (0,1 % ДМСО, необроблені контрольні клітини) або збільшуючи концентрацію сполуки 2-3. Після 72 годин інкубації в концентрації від 0,1 до 30 мкМ сполука 2-3 продемонструвала дозозалежні цитотоксичні активності проти отриманих від пацієнтів з CRC чотирьох різних типів клітин, зафіксованих зі свіжих біоптатів метастазів печінки (таблиця 14).

Таблиця 14

Аналіз інгібування росту клітин, отриманих від пацієнтів з метастазуючим у печінку CRC, у присутності сполуки 2-3

CRC ID	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
EC ₅₀ (мкМ)	1,88	1,22	1,45	1,12

Оцінка in vitro сполуки 2-3 на Aldefluor™-позитивних клітинах з числа клітин, отриманих від пацієнтів з метастазуючим у печінку CRC

Клітини спочатку висівали при щільності 250000 клітин/1000 мкл на ямку в P96-ямкові планшети і інкубували в зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °C протягом 24 годин. Клітини потім інкубували з розчинником (0,1 % ДМСО) або збільшуючи концентрацію сполуки 2-3 протягом 72 годин. Клітини трипсинізували, збирали і промивали. Безклітинні частинки і мертві клітини виключали на основі низького розсіювання світла і позитивного фарбування мертвих клітин барвником Sytox Blue (Life Technologies) з використанням проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi biotec). Відсоток ALDH^{яскравих}-клітин потім визначали кількісно, використовуючи аналіз Aldefluor™ (Stemcell Technologies, 01700). Для забезпечення точної ідентифікації ALDH-позитивних клітин додавали інгібітор ALDH, діетиламінобензальдегід (DEAB). Коли застосовували інгібітор ALDH, DEAB, флуоресценцію знижували (зрушували вліво) і малювали гейт (обмежену область клітин), щоб визначити верхню межу цих клітин. Цей гейт використовували для вибору ALDH-високотривалого субпопуляції. Як показано, після 72 годин інкубації в концентрації від 1 до 3 мкМ сполука 2-3 демонструє значні (p<0,001) і дозозалежні цитотоксичні активності проти субпопуляції Aldefluor™-позитивних клітин з отриманих від пацієнтів з CRC трьох різних типів клітин, зафіксованих зі свіжих біоптатів метастазів печінки (Фігура 1).

Сполука 2-3 блокує утворення пухлинних сфер із клітин, отриманих від пацієнтів з метастазуючим у печінку CRC.

Утворення пухлинної сфери in vitro широко використовується для ідентифікації наявності ракових стовбурових клітин (CSC) у солідних пухлинах або гетерогенних популяціях клітин, оскільки тільки ці клітини мають здатність до самовідновлення. Ми використовували цей аналіз як функціональну міру частоти і життєздатності CSC, а також вивчили здатність клітин, отриманих від пацієнтів з метастазами в печінці, утворювати пухлинні сфери після обробки сполукою 2-3. З цією метою клітини спочатку вирощували в тканинній культуральній колбі з повним середовищем DMEM з фетальною бичачою сироваткою (FBS) у вигляді моношару, поки вони не досягали наближення до конфлюентності. Клітини трипсинізували, збирали, промивали для видалення FBS і пропускали через сито з ямками 40 мкм. Суспензію окремих клітин потім культивували в середовищі для CSC (тобто в середовищі M11), яке складається з DMEM-F12, доповненим 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF і додаванням N2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США), у P96-ямкових планшетах з ультра-низьким зв'язуванням (Corning Life Sciences, Тьюксбері, Массачусетс). Клітини висівали при щільності 500 клітин/100 мкл на ямку і інкубували в зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °C. Для визначення впливу сполуки 2-3 на ефективність утворення пухлинних сфер і розмір сфери, сполуку 2-3 додавали в двох концентраціях (0,3 мкМ або 3 мкМ) через 24 години після посіву в кінцевому об'ємі 200 мкл M11. Через 10 днів планшети досліджували на утворення пухлинної сфери (>50 мкм) з використанням інвертованого мікроскопа. Робили знімки фазового контрасту, розмір і кількість сфер вимірювали вручну і підраховували на основі зображень, використовуючи ImageJ. Як показано на фігурі 2, сполука 2-3 індукує сильне і дозозалежне зменшення утворення пухлинних сфер у трьох тестувальних клітинах, отриманих від пацієнтів з CRC, виділених з печінкових метастазів (CPP19, CPP30 і CPP36). Дійсно, ефективність утворення пухлинних сфер значно

пригнічувалась 3 мкМ сполукою 2-3. Навпаки, розмір пухлини не був статистично зменшений обробкою, за винятком 3 мкМ на клітинах CPP19 ($p=0,02$).

Приклад 10: Дослідження інгібування росту (EC_{50} , мкМ) клітин, отриманих від пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою (HCC), у присутності сполуки 2-3

5 Клітини, отримані від пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою (HCC), брали після отримання письмової інформованої згоди згідно зі схваленням Інституціональної наглядацької ради CrownBio і під суворим дотриманням Гельсінської декларації про медичні дослідження за участю людей.

10 Клітини, отримані від пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою (HCC), підтримували в середовищі, відповідно описаному у таблиці 15, яке містить 1 % пеніциліну-стрептоміцину (Life Technologies, 15070-063), з добавками для первинної клітинної культури (PCS), яка містить гідрокортизон (50 нМ), епідермальний фактор росту (20 нг/мл), фактор росту β -фібробластів (10 нг/мл), гепарин (2 мкг/мл), рідку добавку ITS до середовища (1 $\times$) і заміну амінокислоту (NEAA, 0,01 мМ, 1 $\times$). Первинні клітини культивували у зволоженій атмосфері (відносна вологість 95 %) з 15 5 % CO_2 при 37 °C.

Таблиця 15

Культуральне середовище і умови культивування
для клітин гепатоцелюлярної карциноми (HCC), отриманих від пацієнтів

Пункт	Первинна клітина	Культуральне середовище	Умови культивування
1	LI0050	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %
2	LI0574	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %
3	LI0612	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %
4	LI0752	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %
5	LI0801	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %
6	LI1005	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %
7	LI1098	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %
8	LI1646	DMEM/F12+10 % FBS+PCS	37 °C, 5 % CO_2 , відносна вологість 95 %

20 Аналіз інгібування росту клітин здійснювали, як описано раніше в прикладі 5, з використанням люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo®, як описано виготовлювачем (Promega, Ref G7571). Кількість клітин, посіяних на ямку (у TC-оброблених 96-ямкових мікропланшетах із плоским прозорим дном з чорного полістиролу, № за каталогом 3340, Corning®), описано в таблиці 16. На дно кожної пластини перед записом люмінесценції CellTiter-Glo® вміщували чорну наклейку, яка забезпечує непрозорість (№ за каталогом 6005189, Perkin Elmer).

25

Таблиця 16

Кількість клітин, посіяних на ямку для аналізу життєздатності клітин,
отриманих від пацієнтів з НСС

Пункт	Клітини, отримані від пацієнтів з НСС	Кількість клітин на ямку
1	LI0050	2500
2	LI0574	3000
3	LI0612	4000
4	LI0752	3500
5	LI0801	2500
6	LI1005	2500
7	LI1098	2000
8	LI1646	2000

Експериментальні дані аналізували з використанням комп'ютерної програми Graphpad Prism V 5.0 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Каліфорнія), і значення EC_{50} визначали як дозу сполуки, необхідну для зниження значень оптичної густини до 50 % сигналу, отриманого для клітинних культур, оброблених розчинником, і являли собою середнє значення щонайменше із трьох незалежних експериментів.

Після 72 годин інкубації сполука 2-3 демонструвала дозозалежні цитотоксичні активності проти восьми різних типів клітин, отриманих від пацієнтів з НСС (див. таблицю 17).

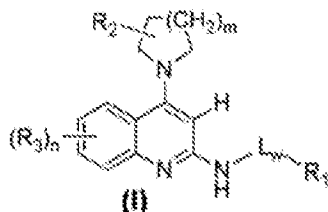
Таблиця 17

Аналіз інгібування росту клітин, отриманих від пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою (НСС), у присутності сполуки 2-3, сорафенібу і цисплатину

Пункт	Клітини, отримані від пацієнтів з НСС	EC_{50} (мкМ)		
		2-3	Сорафеніб	Цисплатин
1	LI0050	3,5	9,1	1,3
2	LI0574	2,4	8,7	3,6
3	LI0612	6,9	17,9	16,3
4	LI0752	0,5	6,3	2,6
5	LI0801	2,1	5,7	1,5
6	LI1005	3,2	14,5	5,9
7	LI1098	7,0	10,9	5,1
8	LI1646	1,4	10,3	10,0

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука формули (I)



у якій

R_1 вибраний з C6-C10арилу, заміщеного або не заміщеного R_9 ; гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S, заміщеного або не заміщеного R_9 ; конденсованого гетероарилу згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи

1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю, заміщеного або не заміщеного R₉;

L_w вибраний з необов'язково заміщеного (C1-C10)алкілу; (C1-C10)алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного R₄; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкінілу; C=O; SO; SO₂; (C=O)-NR₈; (C=O)-O; (C=O)-O-(C1-C4)алкілу; SO₂-NR₈; NR₈; де R₄ вибраний з H; необов'язково заміщеного (C1-C10)алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10)циклоалкінілу; необов'язково заміщеного (C6-C10)арилу; гетероарильного 5-8-членного кільця або конденсованого гетероарилу згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю, заміщеного або не заміщеного однією або декількома групами замісників, незалежно вибраних з водню, атома галогену, (C1-C10)алкілу, заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C1-C10)алкокси, гідроксилу, ціано, нітро, карбокси, NR₈R₈; 4-9-членного насиченого або ненасиченого кільця, яке містить 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S;

R₂ вибраний з NR₅R₆;

R₃ вибраний з атома водню; атома галогену; (C1-C10)алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, гідроксидом, алкокси, -NR₅R₆; (C2-C10)алкенілу; (C2-C10)алкінілу; (C3-C10)циклоалкілу; (C5-C10)циклоалкенілу; (C8-C10)циклоалкінілу; (C1-C10)алкокси; гідроксилу; нітро; ціано; NR₅R₆; O-(R₇); (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)-NR₅R₆; O-(CO)-R₇; O-(CO)-NR₅R₆; NR₅(CO)-R₇; NR₅(CO)-OR₇; NR₅(CO)-NR₅R₆; -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁; SO₂-R₇; NR₅-SO₂-R₇; SO₂-NR₅R₆; NR₅-(C2-C6)-алкіл-NR₅R₆; необов'язково заміщеного ариллу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеного конденсованого гетероарилу згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю; необов'язково заміщеного гетероциклільного 4-9-членного кільця, насиченого або ненасиченого, яке містить 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S;

R₅ і R₆ незалежно вибрані з водню; необов'язково заміщеного (C1-C10)алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10)циклоалкінілу; (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)-NR₈R₈; SO₂-R₇; SO₂-NR₈R₈; (C1-C10)алкілу, заміщеного NR₈R₈; (C3-C10)циклоалкілу, заміщеного NR₈R₈; необов'язково заміщеного ариллу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеного гетероциклільного 4-9-членного кільця, насиченого або ненасиченого, яке містить 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S; або R₅ і R₆ зв'язані разом з атомом азоту, до якого вони ковалентно приєднані, з утворенням гетероциклільної групи, яка утворює 4-9-членне кільце, яке може містити додаткові 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

R₇ і R₇ незалежно вибрані з водню; необов'язково заміщеного (C1-C10)алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10)циклоалкінілу; C1-C10 лінійного або розгалуженого алкілу, заміщеного NR₈R₈; необов'язково заміщеного (C6-C10)арилу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероароматичного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

R₈ і R₈ незалежно вибрані з водню; необов'язково заміщеного (C1-C10)алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10)циклоалкінілу; або R₈ і R₈ зв'язані разом з атомом азоту, до якого вони ковалентно приєднані, з утворенням гетероциклільної групи, яка утворює 4-9-членне кільце, яке може містити додаткові 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

R₉ незалежно вибраний з водню; атома галогену; необов'язково заміщеного (C1-C10)алкілу; (C1-C10)алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного одним або декількома атомами галогену, гідроксидом, алкокси; необов'язково заміщеного (C2-C10)алкенілу; необов'язково заміщеного (C2-C10)алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C5-C10)циклоалкінілу; необов'язково заміщеного (C6-C10)арилу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероароматичного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;

- заміщеного (C5-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10)циклоалкінілу; необов'язково заміщеного (C1-C10)алкокси; гідроксилу; нітро; ціано; NR₅R₆; (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)-NR₅R₆; O-(CO)-R₇; O-(CO)-NR₅R₆; NR₅-(CO)-R₇; NR₅-(CO)-OR₇; NR₅-(CO)-NR₅R₆; SO₂-R₇; NR₅-SO₂-R₇; SO₂-NR₅R₆; (C1-C10)алкілу, заміщеного NR₅R₆; NR₅-(C2-C10)алкіл-NR₅R₆; -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁'; необов'язково заміщеного (C6-C10)арилу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеної гетероциклільної групи, яка утворює 4-9-членне кільце, яке може містити 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; -NR₅R₁₀; -O-R₁₀;
- 10 R₁₀ незалежно вибраний з водню; (C6-C12)арилу, заміщеного або не заміщеного R₁₂; бензилу, заміщеного або не заміщеного R₁₂; гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S, заміщеного або не заміщеного R₁₂; конденсованого гетероарилу, визначеного як такий, що містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і як такий, що містить щонайменше 2 атоми вуглецю,
- 15 заміщеного або не заміщеного R₁₂; гетероциклілу, який утворює 4-9-членне кільце, яке може містити 0, 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S, заміщеного або не заміщеного R₁₂; R₁₁ і R₁₁' незалежно вибрані з атома водню; необов'язково заміщеного (C2-C10)алкілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкенілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)алкінілу; необов'язково заміщеного (C3-C10)циклоалкілу; необов'язково заміщеного (C5-C10)циклоалкенілу; необов'язково заміщеного (C8-C10)циклоалкінілу; (C2-C10)алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену; або R₁₁ і R₁₁' зв'язані разом з атомом азоту, до якого вони ковалентно приєднані, з утворенням гетероциклільної групи, яка утворює насичене або ненасичене 4-9-членне кільце, яке може містити додаткові 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S;
- 25 R₁₂ вибраний з атома водню; атома галогену; (C1-C10)алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, гідроксидом, алкокси, NR₁₁R₁₁'; (C2-C10)алкенілу; (C2-C10)алкінілу; (C3-C10)циклоалкілу; (C5-C10)циклоалкенілу; (C8-C10)циклоалкінілу; (C1-C10)алкокси; гідроксилу; нітро; ціано; NR₁₁R₁₁'; O-(R₇); (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)-NR₁₁R₁₁'; O-(CO)-R₇; O-(CO)-NR₁₁R₁₁'; NR₁₁-(CO)-R₇; NR₁₁-(CO)-OR₁₁'; NR₁₁-(CO)-NR₁₁R₁₁'; -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁'; SO₂-R₇; NR₅-SO₂-R₇; SO₂-NR₁₁R₁₁'; NR₁₁-(C2-C6)-алкіл-NR₁₁R₁₁'; необов'язково заміщеного ариллу; необов'язково заміщеного бензилу; необов'язково заміщеного гетероарильного 5-8-членного кільця, яке містить 1, 2 або 3 гетероатоми, вибрані з O, N і S; необов'язково заміщеного конденсованого гетероарилу згідно з визначенням, який містить від 8 до 13 атомів, включаючи 1, 2, 3, 4 гетероатоми, вибрані з O, N і S, і який містить щонайменше 2 атоми вуглецю; необов'язково заміщеного гетероциклільного 4-9-членного кільця, насиченого або ненасиченого, яке містить 1, 2 або до 3 гетероатомів, незалежно вибраних з O, N і S;
- 30 n може являти собою рівне ціле число, яке може мати будь-яке зі значень 0, 1, 2, 3 або 4; m може являти собою рівне ціле число, яке може мати будь-яке зі значень 1, 2 або 3; w може являти собою рівне ціле число, яке може мати будь-яке зі значень 0 або 1;
- 40 де термін "необов'язково заміщений" означає необов'язково заміщений одним або декількома замісниками, незалежно вибраними з атома галогену, (C1-C10)алкілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C2-C10)алкенілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C2-C10)алкінілу, лінійного або розгалуженого, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C3-C10)циклоалкілу, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C5-C10)циклоалкенілу, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C8-C10)циклоалкінілу, заміщеного або не заміщеного одним або декількома атомами галогену, (C1-C10)алкокси, гідроксилу, ціано, нітро, NR₈R₈' (з R₈ і R₈', як описано вище);
- 50 і будь-які її фармацевтично прийнятна сіль, сольват, ізомери, стереоізомери або суміші стереоізомерів, сольват або проліки.
2. Сполука за п. 1, вибрана з 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (1-5); 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (2-2); 2-[3-метил-4-(піримідин-2-іламіно)феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (3-4); 22-[4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метилфеніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (4-2), або її фармацевтично прийнятна сіль, сольват або проліки.
3. Сполука за п. 1, вибрана з гідрохлоридної солі 2-(4-хлорфеніламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (1-6), гідрохлоридної солі 2-(4-хлорбензиламіно)-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (2-3), гідрохлоридної солі 2-[3-метил-4-(піримідин-2-
- 60

іламіно)феніламіно]-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (3-5), гідрохлоридної солі 2-{4-[4-(піридин-3-іл)-2-піримідинаміно]-3-метилфеніламіно}-4-(4-трет-бутиламінопіперидин-1-іл)-хіноліну (4-3), або її фармацевтично прийнятний сольват або проліки.

4. Фармацевтична композиція, яка містить терапевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-3 або її фармацевтично прийнятної солі, сольвату або проліків і фармацевтично прийнятний ад'ювант, розріджувач або носій.

5. Фармацевтична композиція за п. 4, яка додатково містить один або декілька протипухлинних засобів.

6. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 4 і 5, у якій терапевтично ефективна кількість сполуки за будь-яким із пп. 1-5 знаходиться в складі або знаходиться в комбінації в складі наночастинок.

7. Фармацевтична композиція за п. 6, у якій наночастинок містять полімерну біорозкладану композицію.

8. Фармацевтична композиція за п. 7, у якій полімер оснований на полі(DL-молочній-со-гліколевої кислоти), який має молекулярну масу від 7 до 240 кДа; або співполімері полімолочної кислоти (PLA) і полігліколевої кислоти (PGA), де молекулярне співвідношення може знаходитися в інтервалі від 95:5 до 50:50.

9. Фармацевтична композиція за п. 6, у якій наночастинок містять лізосомальну біорозкладану композицію.

10. Фармацевтична композиція за п. 6, у якій наночастинок містять біосумісний полімер або співполімер.

11. Фармацевтична композиція за п. 6, у якій наночастинок містять ліпосомальний склад.

12. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 6-11, у якій наночастинок зв'язані ковалентно або нековалентно з поліетиленгліколем (PEG).

13. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 6-12, у якій наночастинок мають середній розмір від приблизно 80 до приблизно 600 нм.

14. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 6-13, у якій сполука за будь-яким із пп. 1-3 діє спільно щонайменше з одним терапевтично активним протираковим засобом.

15. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 6-14, яка придатна для перорального, парентерального, офтальмологічного, трансдермального, назального введення або для інгаляції.

16. Фармацевтична композиція за п. 6, у якій наночастинок містять елемент, вибраний із наночастинок PLGA, наночастинок PLGA-PEG (блок типу AB, BA, ABA або BAB, де A=PLGA і B=PEG) і специфічних наночастинок.

17. Фармацевтична композиція за п. 16, у якій наночастинок являє собою специфічну наночастинок, яка містить сигнальний мотив.

18. Фармацевтична композиція, яка містить комбінацію терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-3 і терапевтично ефективної кількості одного або декількох протипухлинних засобів, де компоненти, які складають зазначену комбінацію, призначені для одночасного, окремого або послідовного застосування в терапії раку.

19. Фармацевтична композиція за п. 5 або п. 18, де протипухлинний засіб вибраний із групи, яка складається з еверолімусу, хлорохіну, гідроксихлорохіну, трабектедину, абраксану, TLK 286, AV-299, DN-101, пазопаніб, GSK690693, RTA 744, ON O91O.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, ензастаурину, вандетаніб, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, пеметрексед, ерлотиніб, дазатаніб, нілотиніб, декатаніб, панітумумабу, амрубіцину, ореговумабу, Lep-etu, нолатрексед, azd2171, батабуліну, офатумумабу, заноліумабу, едотекарину, тетрандрину, рубітекану, тесміліфену, облімерсену, тициліумабу, іпіліумабу, госиполу, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, циленгітиду, гіматекану, IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, люкантону, LY 317615, нейрадіабу, вітеспану, Rta 744, Sdx 102, талампанелю, атрасентану, Xr 311, ромідепсину, ADS-100380, сунітиніб, 5-фторурацилу, вориностату, етопозиду, гемцитабіну, доксорубіцину, іринотекану, ліпосомального доксорубіцину, 5'-дезоксид-5-фторуридину, вінкристину, темозоломід, ZK-304709, селіцикліб, PD0325901, AZD-6244, капецитабіну, динатрієвої солі N-[4-[2-2-аміно-4,7-дигідро-4-оксо-1H-піроло[2,3-d]піримідин-5-іл)етил]бензоіл]-L-глутамінової кислоти гептагідрату, камптотецину, PEG-міченого іринотекану, тамоксифену, цитрату тореміфену, анастразолу, екземестану, летрозолу, DES (діетилстильбестрол), естрадіолу, естрогену, кон'югованого естрогену, бевацизумабу, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(метилсульфоніл)піперазинметил]-індоліл]-хінолону, ваталаніб, AG-013736, AVE-0005, ацетатної солі [D-Ser(But)₆, Azgly₁₀] (пепто-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ ацетат, гозереліну ацетат), лейпролід ацетату, триптореліну памоату, медроксипрогестерону

- ацетату, гідроксипрогестерону капроату, мегестролу ацетату, ралоксифену, бікалутаміду, флутаміду, нілутаміду, мегестролу ацетату, CP-724714; TAK-165, HKI-272, ерлотинібу, лапатанібу, канертинібу, ABX-EGF-антитіла, ербітуксу, EKB-569, PKI-166, GW-572016, лонафарнібу, BMS-214662, типіфарнібу; аміфостину, NVP-LAQ824, субероіланлідгідроксисомової
- 5 кислоти, вальпроєвої кислоти, трихостатину А, FK-228, SU11248, сорафенібу, KRN951, аміноглутетиміду, амсакрину, анагреліду, L-аспарагінази, вакцини на основі бацили Кальметта-Герена (BCG), блеомицину, бусереліну, бусульфану, карбоплатину, кармустину, хлорамбуцилу, цисплатину, кладрибіну, клодронату, ципротерону, цитарабіну, дакарбазину, дактиномицину, даунорубіцину, діетилстилбестролу, епірубіцину, флударабіну, флудрокортисону,
- 10 флуоксиместерону флутаміду, гемцитабіну, глівеку, гідроксисечовини, ідарубіцину, іфосфаміду, іматинібу, лейпроліду, левамизолу, ломустину, мехлоретаміну, мелфалану, 6-меркаптопурина, месни, метотрексату, мітоміцину, мітотану, мітоксантрону, нілутаміду, октреотиду, оксаліплатину, памідронату, пентостатину, плікаміцину, порфімеру, прокарбазину, ралтитрекседу, ритуксимабу, стрептозоцину, теніпозиду, тестостерону, талідоміду, тіогуаніну,
- 15 тіотепи, третиноїну, віндезину, 13-цис-ретиноєвої кислоти, фенілаланіну мустарду, урацилу мустарду, естрамустину, алтретаміну, флоксуридину, 5-дезоксіуридину, цитозинарабінозиду, 6-меркаптопурина, дезоксикоформіцину, кальцитріолу, валрубіцину, мітраміцину, вінбластину, вінорелбіну, топотекану, разоксину, маримастату, COL-3, неовастату, BMS-275291, скваламіну, ендостатину, SU5416, SU6668, EMD121974, інтерлейкіну-12, 1M862, ангіостатину, вітаксину,
- 20 дролоксифену, ідоксифену, спіронолактону, фінастериду, цимітидину, трастузумабу, денілейкіну дифтитоксу, гефітінібу, бортезимибу, паклітакселу, іринотекану, топотекану, доксорубіцину, доцетакселу, вінорелбіну, бевацизумабу (моноклональне антитіло) і ербітуксу, паклітакселу, який не містить кремофору, епітилону В, BMS-247550, BMS-310705, дролоксифену, 4-гідрокситамоксифену, піпендоксифену, ERA-923, арзоксифену, фулвестранту,
- 25 аколбіфену, лазофоксифену, ідоксифену, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK222584, VX-745, PD 184352, рапаміцину, 40-О-(2-гідроксіетил)рапаміцину, темсиролімусу, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, вортманіну, ZM336372, L-779450, PEG-філграстиму, дарбепоетину, еритропоетину, колонієстимулюючого фактора гранулоцитів, золендронату, преднізону, цетуксимабу, колонієстимулюючого фактора
- 30 гранулоцитів-макрофагів, гістреліну, пегильованого інтерферону альфа-2а, інтерферону альфа-2а, пегильованого інтерферону альфа-2b, інтерферону альфа-2b, азацитидину, PEG-L-аспарагінази, леналідоміду, гемтузумабу, гідрокортисону, інтерлейкіну-11, декстразоксану, алемтузумабу, повністю транс-ретиноєвої кислоти, кетоконазолу, інтерлейкіну-2, мегестролу, азотистого іприту, метилпреднізолону, ібритгумомабу тіуксетану, андрогенів, децитабіну,
- 35 гексаметилмеламіну, бексаротену, тозитумомабу, триоксиду миш'яку, кортизону, едитронату, мітотану, циклоспорину, ліпосомного даунорубіцину, аспарагінази Едвіна, стронцію 89, касопітанту, нетупітанту, антагоністів рецептора NK-1, палоносетрону, апрепітанту, дифенгідраміну, гідроксизину, метоклопраміду, лоразепаму, аллоперидолу, дроперидолу, дронабінолу, дексаметазону, метилпреднізолону, прохлорперазину, гранісетрону,
- 40 ондансетрону, доласетрону, тропісетрону, пегфілграстиму, епоетину альфа і дарбепоетину альфа, іпілумабу, вемурафенібу, інгібітору FLT-3, інгібітору VEGFR, інгібітору TK EGFR, інгібітору авророкінази, модулятора PIK-1, інгібітору Bcl-2, інгібітору HDAC, інгібітору c-MET, інгібітору PARP, інгібітору Cdk, інгібітору TK EGFR, інгібітору IGFR-TK, антитіла проти HGF, інгібіторів кінази PI3, інгібітору mTOR, інгібітору AKT, інгібітору JAK/STAT, інгібітору контрольної
- 45 точки 1 або 2, інгібітору кінази фокальної адгезії, інгібітору кінази Мар-кінази (MEK), антитіла-пастки VEGF і їхніх сумішей.
20. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 4-19, яка придатна для уповільненого або пролонгованого вивільнення.
21. Сполука за будь-яким з пп. 1-3 для застосування в терапії.
- 50 22. Сполука за будь-яким з пп. 1-3 для застосування як терапевтично активної речовини для лікування і/або профілактики проліферативного і/або неопластичного захворювання.
23. Сполука за п. 22, де проліферативне і/або неопластичне захворювання вибране з групи, яка складається з: карциноми; голови, нирки, печінки, легені, носоглотки, шиї, яєчника, грудей, шийки матки, підшлункової залози, передміхурової залози або шлунка; лейкемії (наприклад,
- 55 гострої мієлогенної лейкемії, гострої лімфоцитарної лейкемії, гострої промієлоцитарної лейкемії (ГПЛ), гострої Т-клітинної лімфобластної лейкемії, Т-клітинної лейкемії дорослих, базофільної лейкемії, еозинофільної лейкемії, гранулоцитарної лейкемії, лейкемії волосатих клітин, лейкопенічної лейкемії, лімфатичної лейкемії, лімфобластної лейкемії, лімфоцитарної лейкемії, мегакаріоцитарної лейкемії, мікромієлобластної лейкемії, моноцитарної лейкемії, нейтрофільної
- 60 лейкемії і лейкемії стовбурових клітин); злоякісної лімфоми, злоякісної меланоми;

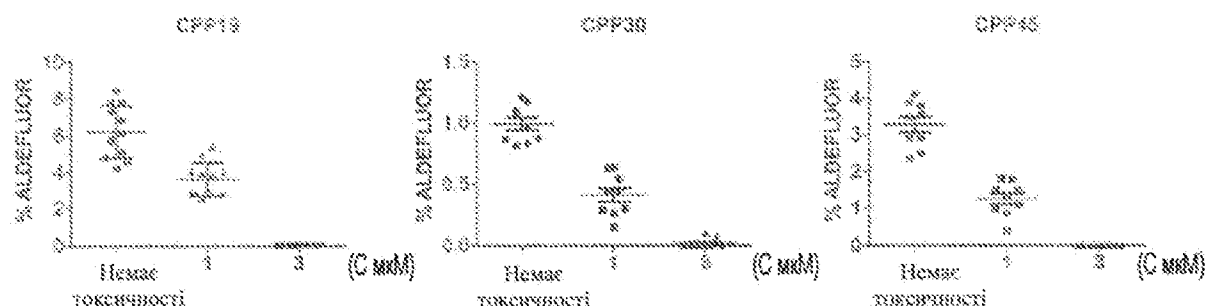
мієлопроліферативних захворювань; саркоми; пухлини центральної нервової системи; пухлини зародкової лінії; раку яєчок; раку щитовидної залози; астроцитомі; раку стравоходу; раку товстої кишки і неоплазії змішаного типу.

24. Спосіб лікування і/або профілактики проліферативного і/або неопластичного захворювання, який включає стадію введення терапевтично активної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-3 або фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 4-20 людині або тварині, яка потребує цього.

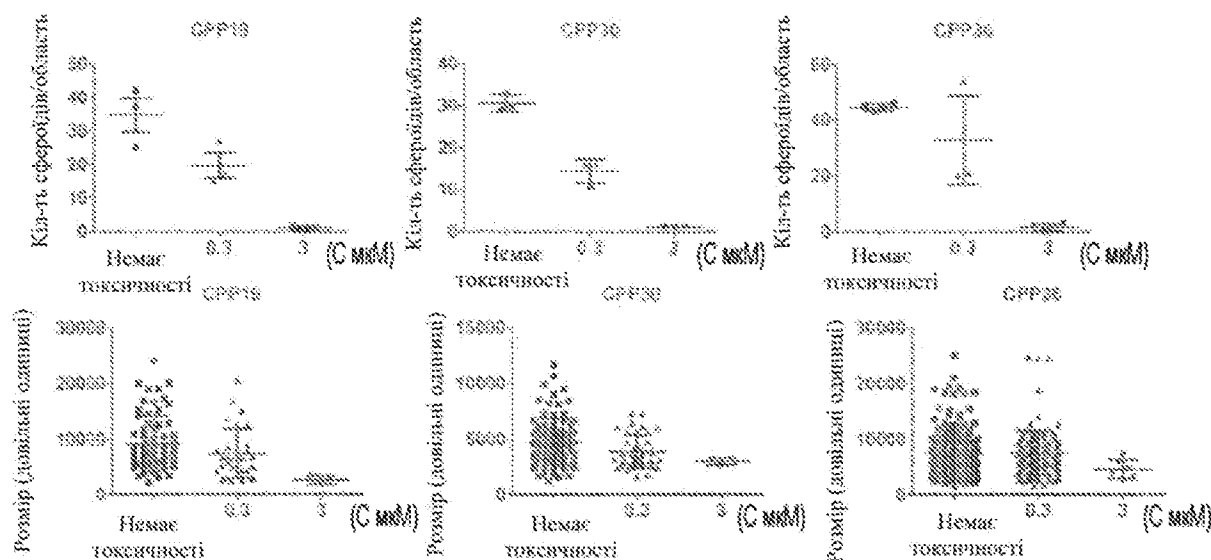
25. Спосіб інгібування росту або диференціювання ракової стовбурової клітини (CSC), пухлино-ініціувальної клітини, мезенхімальноподібної клітини, пов'язаної з раком, мезенхімальної ракової клітини або мезенхімальної клітини, який включає стадію введення терапевтично активної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-3 або фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 4-20 людині або тварині, яка потребує цього.

26. Сполука за будь-яким із пп. 1-3 або фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 4-20 для лікування і/або профілактики проліферативного і/або неопластичного захворювання.

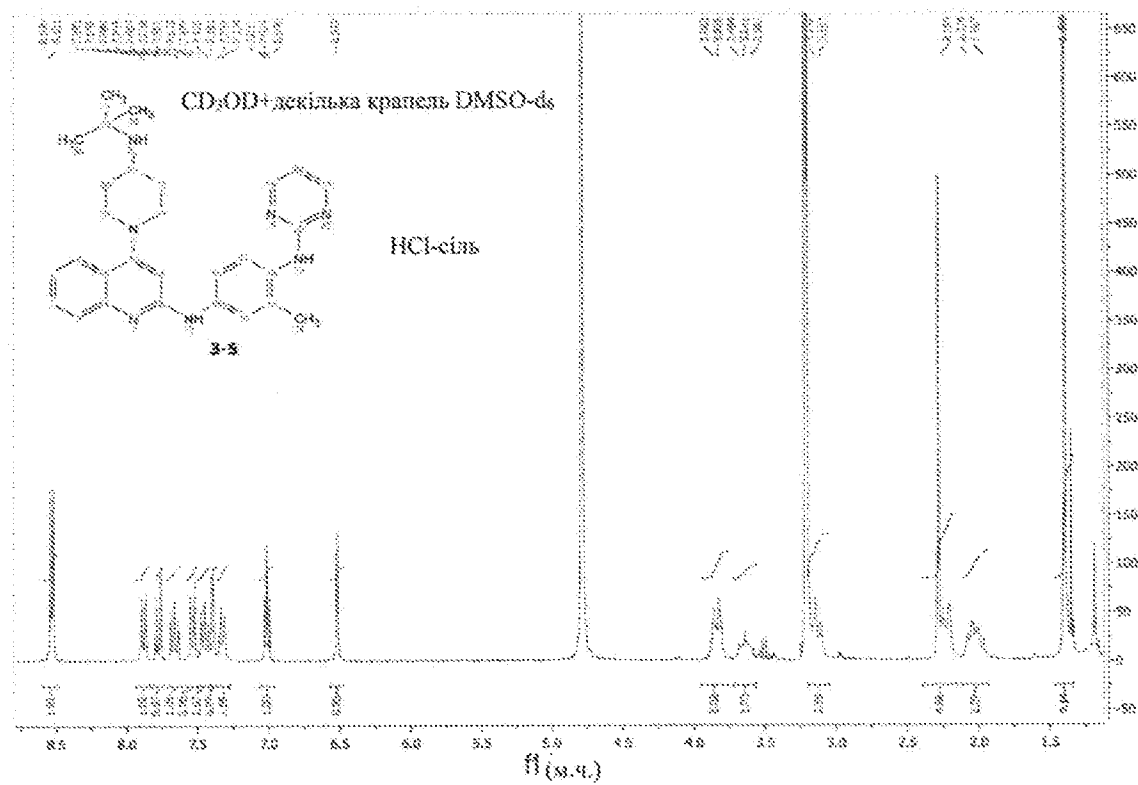
27. Сполука за будь-яким із пп. 1-3 або фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 4-20 для інгібування росту або диференціювання ракової стовбурової клітини (CSC), пухлино-ініціувальної клітини, мезенхімальноподібної клітини, пов'язаної з раком, мезенхімальної ракової клітини або мезенхімальної клітини.



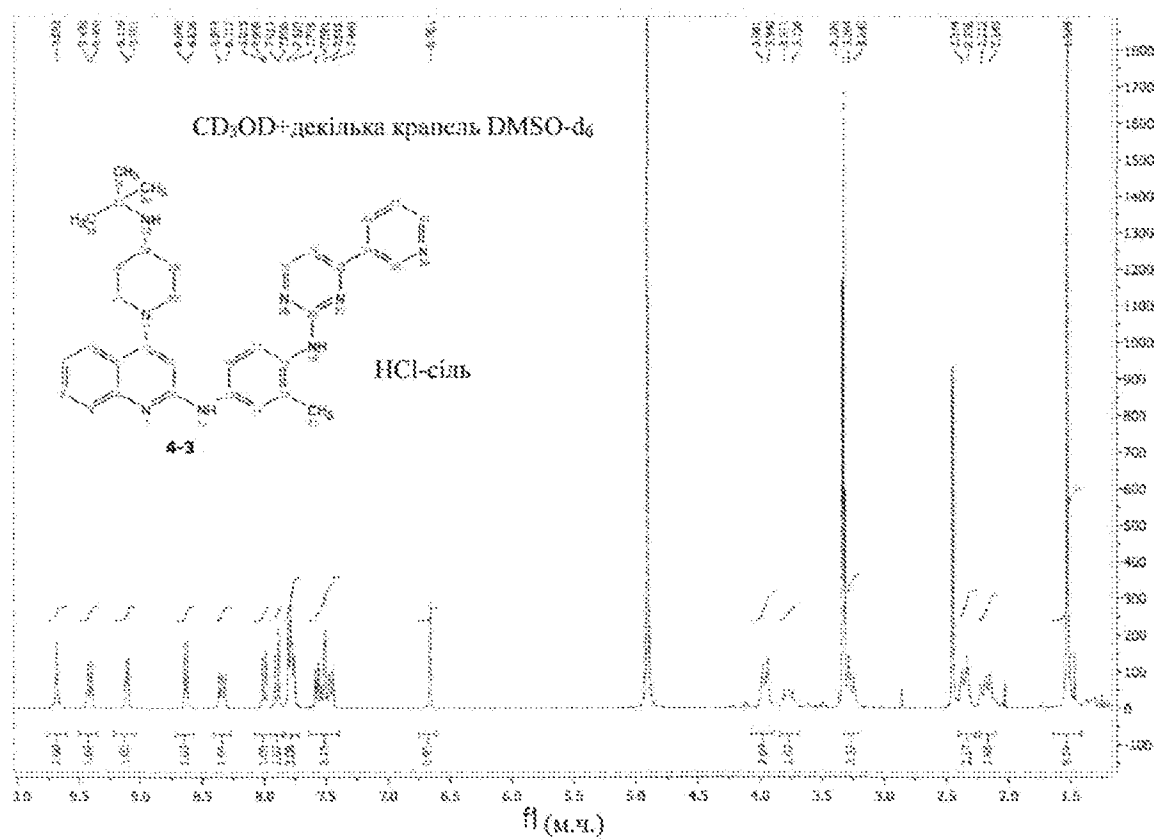
Фиг.1



Фиг.2



Фиг.5



Фиг.6

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

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

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