

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) **201790949** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2018.02.28

(22) Дата подачи заявки  
2015.10.26

(51) Int. Cl. *C07D 401/04* (2006.01)  
*A61K 31/47* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **ЗАМЕЩЕННЫЕ 2,4-ДИАМИНОХИНОЛИНЫ В КАЧЕСТВЕ НОВЫХ  
ПРОТИВОРАКОВЫХ СРЕДСТВ**

---

(31) 62/073,325

(32) 2014.10.31

(33) US

(86) PCT/IB2015/002438

(87) WO 2016/067112 2016.05.06

(71) Заявитель:  
ДЖЕНОСАЙЕНС ФАРМА (FR)

(72) Изобретатель:  
Бассисси Фира, Бере Антуан, Брен  
Сонья, Куркамбек Жером, Дюбре  
Кларисс, Николя Грегори, Альфон  
Филипп (FR)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым производным 2-первичный amino-4-вторичный amino-хинолина, их получению, фармацевтическим композициям, содержащим их, и их применению в качестве лекарственных средств. Активные соединения по настоящему изобретению пригодны для лечения и профилактики пролиферативных неопластических и ненеопластических заболеваний.

**A1**

**201790949**

**201790949**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-542334ЕА/032

### ЗАМЕЩЕННЫЕ 2,4-ДИАМИНОХИНОЛИНЫ В КАЧЕСТВЕ НОВЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ СРЕДСТВ

#### Описание

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к новым производным 2-первичный amino-4-вторичный amino-хинолина, их получению, фармацевтическим композициям, содержащим их, и их применению в качестве лекарственных средств. Активные соединения по настоящему изобретению пригодны для лечения и профилактики пролиферативных неопластических и ненеопластических заболеваний.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Открытие новых противораковых препаратов недавно перешло от клеточного анализа к более узконаправленному подходу *in vitro* на хорошо охарактеризованных, изолированных и экспрессированных с помощью трансфекции белках мишеней, поддающихся воздействию лекарственных средств. Этот белок(белки), выбранный в качестве объекта парадигмы обнаружения новых лекарственных средств, является хорошо известным в данной области техники, с большим усилием полученным в области рациональной разработки ингибиторов киназы человека, позволяющих исследовать человеческий кинем, для обнаружения новых лекарственных средств. Действительно, человеческая киназа может быть мутирована, и дерегулирование киназы обычно происходит при злокачественной трансформации, росте и развитии отдаленных метастазов рака человека. Это участие киназы в развитии и распространении рака хорошо известно, например, при лейкемии, лимфоме, немелкоклеточном раке легкого, меланоме, раке толстой кишки, раке молочной железы, раке почки, гепатокарциноме... В настоящее время, несмотря на это большое усилие, нацеленное на нарушения функции киназы человека в некоторых раковых заболеваниях, клинический прорыв применения ингибиторов киназы в противораковой терапии очевидно не связан с лечением или ремиссией, а некоторые раковые заболевания, по-видимому, остаются по природе резистентными к клиническому

применению ингибиторов киназы (например, гепатоцеллюлярная карцинома). Кроме того, ингибиторы киназы могут выбирать *in vivo* некоторые мутированные и резистентные штаммы, или трансформированные клетки могут найти в одинаковой степени компенсационные пути. В этом контексте мы решили учесть весь клеточный компартмент и среду клеточной культуры с развитием объективного фенотипического клеточного скринингового исследования. Более того, молекулярное понимание и молекулярное описание клеточной трансформации, роста рака и развития метастазов все еще остаются в постоянном развитии, например, недавнее описание концепции раковых стволовых клеток (CSC) или опухоль-инициирующих клеток (TIC). Неожиданные эффекты при клеточном скрининге могут свидетельствовать о других мишенях или специфических взаимодействиях для выявления новой мишени, поддающейся воздействию лекарственных средств. Поэтому разработка новых противораковых средств все еще остается уникальной проблемой с непредсказуемым результатом и местом для открытия новых и инновационных соединений.

Изобретатели получили новую библиотеку ряда разносторонне ориентированных 2-первичный аминокислот-2-вторичный аминокислот-арилхинолиновых соединений, для которой проводили скрининг в отношении набора клеточных линий рака человека (MOLM14, KG-1, MV4-11, A375, HCT116, HepG2, huh-7, MDA-MB-231, SKI-1, 786-O) и полученных от пациентов первичных клеток рака, которые позволяют обнаруживать новые противораковые средства. Более того, этот класс соединений в равной степени проявляет дополнительную активность против человеческих раковых стволовых клеток (CSC), которым широко инкриминируют повторное проявление и рецидив рака после противораковой терапии. Хорошо известный в данной области техники ALDH-анализ использовали в качестве функционального маркера раковых стволовых клеток для описания активности против CSC (Greve, B. с соавт. Cytometry A 2012 (81) 284-293, Liu, S. с соавт. PLoS One 2013 (25) e81050, Ran, D. с соавт. Exp. Hematol. 2009 (37) 1423-1434, Cheung, A. M. с соавт. Leukemia 2007 (21) 1423-1430, Pearce, D. J. с соавт. Stem Cells 2005 (23) 752-760).

Таким образом, целью настоящего изобретения является

предоставление активных средств для предотвращения или ингибирования клеточной пролиферации в различных организмах и предоставление способов их синтеза.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество активных средств по изобретению, отдельно или в комбинации с другими активными средствами, и фармацевтически приемлемый адъювант, разбавитель или носитель.

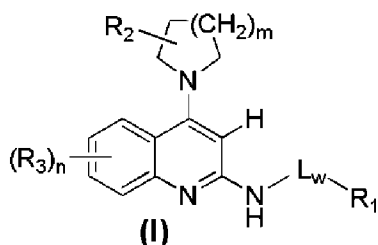
Другой целью настоящего изобретения является предоставление активных средств для применения в терапии.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление способа лечения и/или профилактики пролиферативного и/или неопластического заболевания.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление способа ингибирования роста или дифференцировки раковой стволовой клетки (CSC), опухоль-инициирующей клетки, мезенхимально-подобной клетки, связанной с раком, мезенхимальной раковой клетки или мезенхимальной клетки.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложено соединение формулы (I)



в которой

$R_1$  может быть выбран из C6-C10 арила, замещенного или не замещенного  $R_9$ ; гетероарильного 5-8-членное кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, замещенного или не замещенного  $R_9$ ; конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода, замещенного или не замещенного  $R_9$ ;

$L_w$  может быть выбран из необязательно замещенного (C1-C10) алкила; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного,

замещенного  $R_4$ ; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; C=O; SO; SO<sub>2</sub>; (C=O)-NR<sub>8</sub>; (C=O)-O; (C=O)-O-(C1-C4)алкила; SO<sub>2</sub>-NR<sub>8</sub>; NR<sub>8</sub>; где  $R_4$  может быть выбран из H; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; необязательно замещенного (C6-C10) арила; гетероарильного 5-8-членного кольца или конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода, замещенного или не замещенного одной или несколькими группами заместителей, независимо выбранных из водорода, атома галогена, (C1-C10) алкила, замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C1-C10) алкокси, гидроксила, циано, нитро, карбокси, NR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>', 4-9-членного насыщенного или ненасыщенного кольца, содержащего 1, 2 или до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S;

$R_2$  выбран из NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>;

$R_3$  может быть выбран из атома водорода; атома галогена; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, гидроксильной группой, алкокси, -NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; (C2-C10) алкенила; (C2-C10) алкинила; (C3-C10) циклоалкила; (C5-C10) циклоалкенила; (C8-C10) циклоалкинила; (C1-C10) алкокси; гидроксила; нитро; циано; NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; O-(R<sub>7</sub>); (CO)-R<sub>7</sub>; (CO)-O-R<sub>7</sub>; (CO)-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; O-(CO)-R<sub>7</sub>; O-(CO)-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; NR<sub>5</sub>-(CO)-R<sub>7</sub>; NR<sub>5</sub>-(CO)-OR<sub>7</sub>; NR<sub>5</sub>-(CO)-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OR<sub>11</sub>; -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; SO<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>; NR<sub>5</sub>-SO<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>; SO<sub>2</sub>-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; NR<sub>5</sub>-(C2-C6)-алкил-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; необязательно замещенного арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенного конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1,

2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода; необязательно замещенного гетероциклического 4-9-членного кольца, насыщенного или ненасыщенного, содержащего 1, 2 или до 3 гетероатома, независимо выбранных из O, N и S;

$R_5$  и  $R_6$  могут быть независимо выбраны из водорода; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; (CO)- $R_7$ , (CO)-O- $R_7$ ; (CO)- $NR_8R_8$ ;  $SO_2$ - $R_7$ ;  $SO_2$ - $NR_8R_8$ ; (C1-C10) алкила, замещенного  $NR_8R_8$ ; (C3-C10) циклоалкила, замещенного  $NR_8R_8$ ; необязательно замещенного арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенного гетероциклического 4-9-членного кольца, насыщенного или ненасыщенного, содержащего 1, 2 или до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S; или  $R_5$  и  $R_6$  могут быть связаны вместе с атомом азота, к которому они ковалентно присоединены, с образованием гетероциклической группы, образующей 4-9-членное кольцо, которое может содержать дополнительные 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

$R_7$  и  $R_7$  могут быть независимо выбраны из водорода; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; C1-C10 линейного или разветвленного алкила, замещенного  $NR_8R_8$ ; необязательно замещенного (C6-C10) арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероароматического 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

$R_8$  и  $R_8$  могут быть независимо выбраны из водорода; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно

замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; или  $R_8$  и  $R_8$  могут быть связаны вместе с атомом азота, к которому они ковалентно присоединены, с образованием гетероциклической группы, образующей 4-9-членное кольцо, которое может содержать дополнительные 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

$R_9$  может быть независимо выбран из водорода; атома галогена; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, гидроксильной, алкокси; необязательно замещенного (C2-C10) алкенила; необязательно замещенного (C2-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; необязательно замещенного (C1-C10) алкокси; гидроксильной; нитро; циано;  $NR_5R_6$ ;  $(CO)-R_7$ ;  $(CO)-O-R_7$ ;  $(CO)-NR_5R_6$ ;  $O-(CO)-R_7$ ;  $O-(CO)-NR_5R_6$ ;  $NR_5-(CO)-R_7$ ;  $NR_5-(CO)-OR_7$ ;  $NR_5-(CO)-NR_5R_6$ ;  $SO_2-R_7$ ;  $NR_5-SO_2-R_7$ ;  $SO_2-NR_5R_6$ ; (C1-C10) алкила, замещенного  $NR_5R_6$ ;  $NR_5-(C2-C10)$ -алкил- $NR_5R_6$ ;  $-(O-CH_2CH_2-)_m-OR_{11}$ ;  $-(O-CH_2CH_2-)_m-NR_{11}R_{11}$ ; необязательно замещенного (C6-C10) арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенной гетероциклической группы, образующей 4-9-членное кольцо, которое может содержать 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;  $-NR_5R_{10}$ ;  $-O-R_{10}$ ;

$R_{10}$  может быть независимо выбран из водорода; (C6-C12)-арила, замещенного или не замещенного  $R_{12}$ ; бензила, замещенного или не замещенного  $R_{12}$ ; гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, замещенного или не замещенного  $R_{12}$ ; конденсированного гетероарила, определенного как содержащий от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащий, по меньшей мере, 2 атома углерода, замещенного или не замещенного  $R_{12}$ ; гетероциклила, образующего 4-9-членное

кольцо, которое может содержать 0, 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, замещенного или не замещенного R<sub>12</sub>;

R<sub>11</sub> и R<sub>11</sub>' могут быть независимо выбраны из атома водорода; необязательно замещенного (C2-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; (C2-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена; или R<sub>11</sub> и R<sub>11</sub>' могут быть связаны вместе с атомом азота, к которому они ковалентно присоединены, с образованием гетероциклической группы, образующей насыщенное или ненасыщенное 4-9-членное кольцо, которое может содержать дополнительные 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

R<sub>12</sub> может быть выбран из атома водорода; атома галогена; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, гидроксильной, алкокси, NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; (C2-C10) алкенила; (C2-C10) алкинила; (C3-C10) циклоалкила; (C5-C10) циклоалкенила; (C8-C10) циклоалкинила; (C1-C10) алкокси; гидроксильной; нитро; циано; NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; O-(R<sub>7</sub>); (CO)-R<sub>7</sub>; (CO)-O-R<sub>7</sub>; (CO)-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; O-(CO)-R<sub>7</sub>; O-(CO)-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; NR<sub>11</sub>-(CO)-R<sub>7</sub>; NR<sub>11</sub>-(CO)-OR<sub>11</sub>'; NR<sub>11</sub>-(CO)-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OR<sub>11</sub>'; -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; SO<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>; NR<sub>5</sub>-SO<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>; SO<sub>2</sub>-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; NR<sub>11</sub>-(C2-C6)-алкил-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>'; необязательно замещенного арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенного конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода; необязательно замещенного гетероциклического 4-9-членного кольца, насыщенного или ненасыщенного, содержащего 1, 2 или до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S;

n может представлять собой равное целое число, которое может иметь любое из значений 0, 1, 2, 3 или 4;

m может представлять собой равное целое число, которое может иметь любое из значений 1, 2 или 3;

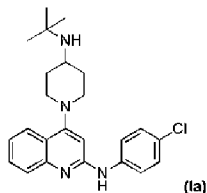
w может представлять собой равное целое число, которое может иметь любое из значений 0 или 1;

Где термин "необязательно замещенный" означает необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из атома галогена, (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C2-C10) алкенила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C2-C10) алкинила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C3-C10) циклоалкила, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C5-C10) циклоалкенила, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C8-C10) циклоалкинила, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C1-C10) алкокси, гидроксила, циано, нитро, NR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>' (с R<sub>8</sub> и R<sub>8</sub>', как описано выше);

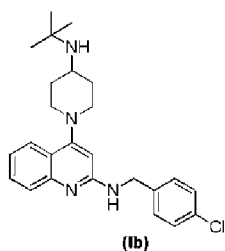
и любые его фармацевтически приемлемая соль, сольват, изомеры, стереоизомеры или смеси стереоизомеров, сольват или пролекарство.

В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретение предоставляет соединение, выбранное из:

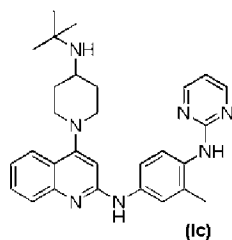
2-(4-хлорфениламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина формулы (Ia) (1-5)



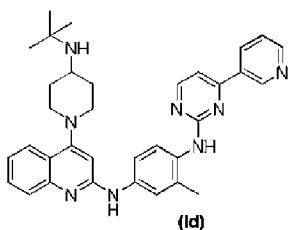
2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина формулы (Ib) (2-2)



2-[3-метил-4-(пиримидин-2-иламино) фениламино]-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (**3-4**) формулы (**Ic**)



2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (**4-2**) формулы (**Id**)



или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или пролекарства.

В некоторых других конкретных вариантах осуществления изобретение предоставляет соединение, выбранное из гидрохлоридной соли 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (**1-6**), гидрохлоридной соли 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (**2-3**), гидрохлоридной соли 2-[3-метил-4-(пиримидин-2-иламино) фениламино]-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (**3-5**), гидрохлоридной соли 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (**4-3**).

В другом аспекте изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, которая может содержать терапевтически эффективное количество вышеуказанного соединения или его фармацевтически

приемлемой соли, сольвата или пролекарства и фармацевтически приемлемый адъювант, разбавитель или носитель.

В некоторых частных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может дополнительно содержать один или несколько противоопухолевых средств.

В некоторых частных вариантах осуществления вышеуказанная фармацевтическая композиция может содержать терапевтически эффективное количество соединения по изобретению, которое может находиться в составе или находиться в комбинации в составе наночастиц.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению наночастицы могут содержать лизосомальную биоразлагаемую композицию.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению наночастицы могут содержать биосовместимый полимер или сополимер.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению наночастицы могут быть связаны ковалентно или нековалентно с полиэтиленгликолем (PEG).

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению наночастицы могут иметь средний размер от приблизительно 80 до приблизительно 600 нм.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению наночастица может быть специфической наночастицей, содержащей сигнальный мотив.

В некоторых конкретных вариантах осуществления наночастицы могут содержать полимерную биоразлагаемую композицию.

В некоторых частных конкретных вариантах осуществления полимер может быть основан на поли(DL-молочная-со-гликолевая кислота), который может иметь молекулярную массу от 7 до 240 кДа; или сополимере полимолочной кислоты (PLA) и полигликолевой кислоты (PGA), где молекулярное соотношение может находиться в интервале от 95:5 до 50:50.

В некоторых конкретных вариантах осуществления

фармацевтической композиции по изобретению наночастицы могут содержать элемент, выбранный из наночастиц PLGA, наночастиц PLGA-PEG (блок типа АВ, ВА, АВА или ВАВ, где А=PLGA и В=PEG) и специфических наночастиц.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению наночастицы могут содержать элемент, выбранный из липосом.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может быть подходящей для замедленного или пролонгированного высвобождения.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может быть подходящей для перорального, парентерального, офтальмологического, трансдермального, назального введения или для ингаляции.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению активное соединение по изобретению может действовать совместно, по меньшей мере, с одним терапевтически активным противораковым средством.

В определенном конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может содержать комбинацию терапевтически эффективного количества соединения по изобретению и терапевтически эффективного количества одного или нескольких противоопухолевых средств, где компоненты, составляющие указанную комбинацию, могут быть предназначены для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии рака.

В конкретных вариантах осуществления фармацевтической композиции по изобретению противоопухолевое средство может быть выбрано из группы, состоящей из эверолимуса, хлорохина, гидроксихлорохина, трабектедина, абраксана, TLK 286, AV-299, DN-101, пазопаниба, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, энзастаурина, вандетаниба, ARQ-197, МК-0457, MLN8054, РНА-739358, R-763, АТ-9263, пеметрекседа, эрлотиниба, дазатаниба, нилотиниба, декатаниба, панитумумаба, амрубицина, ореговомаба, Lep-etu, нолатрекседа, azd2171, батабулина, офатумумаба, занолимумаба,

эдолекарина, тетрандрина, рубитекана, тесмилифена, облимерсена, тицилимумаба, ипилимумаба, госсипола, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, циленгитида, гиматекана, IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, люкантона, LY 317615, нейрадиба, витеспана, Rta 744, Sdx 102, талампанеля, атрасентана, Xr 311, ромидепсина, ADS-100380, сунитиниба, 5-фторурацила, вориностата, этопозид, гемцитабина, доксорубицина, иринотекана, липосомального доксорубицина, 5'-дезоксид-5-фторуридина, винкристина, темозоломида, ZK-304709, селициклиба, PD0325901, AZD-6244, капецитабина, динатриевой соли N-[4-[2-2-амино-4,7-дигидро-4-оксо-1H-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты гептагидрата, камптотецина, PEG-меченого иринотекана, тамоксифена, цитрата торемифена, анастразола, экземестана, летрозолола, DES (диэтилстильбэстрол), эстрадиола, эстрогена, конъюгированного эстрогена, бевацизумаба, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(метилсульфонилпиперазинметил)-индолил]-хинолона, ваталаниба, AG-013736, AVE-0005, ацетатной соли [D-Ser(But)<sub>6</sub>, Azgly<sub>10</sub>] (пироглу-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub> ацетат, гозерелина ацетат), лейпролида ацетата, трипторелина паноата, медроксипрогестерона ацетата, гидроксипрогестерона капроата, мегестрола ацетата, ралоксифена, бикалутамида, флутамида, нилутамида, мегестрола ацетата, CP-724714; TAK-165, HKI-272, эрлотиниба, лапатаниба, канертиниба, ABX-EGF-антитела, эрбитукса, ЕКВ-569, PKI-166, GW-572016, лонафарниба, BMS-214662, типифарниба; амифостина, NVP-LAQ824, субероилланилидгидроксамовой кислоты, вальпроевой кислоты, трихостатина А, FK-228, SU11248, сорафениба, KRN951, аминоклутетимида, амсакрина, анагрелида, L-аспарагиназы, вакцины на основе бациллы Кальметта-Герена (BCG), блеомицина, бусерелина, бусульфана, карбоплатина, кармустина, хлорамбуцила, цисплатина, кладрибина, клодроната, ципротерона, цитарабина, дакарбазина, дактиномицина, даунорубицина, диэтилстилбестрола, эпирубицина, флударабина, флуорокортизона, флуоксиместерона, флутамида, гемцитабина, гливек, гидроксимочевина, идарубицина, ифосфамида, иматиниба, лейпролида, левамизола, ломустина, мехлорэтамидина, мелфалана, 6-

меркаптопурина, месны, метотрексата, митомицина, митотана, митоксантрона, нилутамида, октреотида, оксалиплатина, памидроната, пентостатина, пликамицина, порфимера, прокарбазина, ралтитрекседа, ритуксимаба, стрептозоцина, тенипозид, тестостерона, талидомида, тиогуанина, тиотепы, третиноина, виндезина, 13-цис-ретиноевой кислоты, фенилаланина мустарда, урацила мустарда, эстрамустина, алтретамина, флоксуридина, 5-дезоксинуридина, цитозинарабинозида, 6-меркаптопурина, дезоксигоформина, кальцитриол, валрубицин, митрамицин, винбластин, винорелбин, топотекан, разоксин, маримастат, COL-3, неовастан, BMS-275291, скваламин, эндостатин, SU5416, SU6668, EMD121974, интерлейкин-12, 1M862, ангиостатин, викаксин, дролоксифен, идоксифен, спиронолактон, финастерид, циметидин, трастузумаб, денилейкин дифтитокс, гифитиниб, бортезомиб, паклитаксел, иринотекан, топотекан, доксорубин, доцетаксел, винорелбин, бевацизумаб (моноклональное антитело) и эрбитукс, не содержащего кремфора паклитаксел, эпитилон В, BMS-247550, BMS-310705, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, пипендоксифен, ERA-923, арзоксифен, фулвестрант, аколбифен, лазофоксифен, идоксифен, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK222584, VX-745, PD 184352, рапамицин, 40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, темсиrolimus, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, вортманнин, ZM336372, L-779450, PEG-филграстим, дарбепоедин, эритропоэтин, колониестимулирующего фактора гранулоцитов, золендронат, преднизон, цетуксимаб, колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов, гистрелин, пегилированного интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2а, пегилированного интерферона альфа-2b, интерферона альфа-2b, азацитидин, PEG-L-аспарагиназа, леналидомид, гемтузумаб, гидрокортизон, интерлейкин-11, дексразоксан, алемтузумаб, полностью транс-ретиноевой кислоты, кетоконазол, интерлейкин-2, мегестрол, азотистого иприта, метилпреднизолон, ибритгумомаб тиуксетан, андрогенов, децитабин, гексаметилмеламин, бексаротен, тозитумомаб, трехокиси мышьяка, кортизон, эдитронат, митотан,

циклоспорина, липосомного даунорубина, аспарагиназы Эдвина, стронция 89, касопитанта, нетупитанта, антагонистов рецептора NK-1, палоносетрона, апрепитанта, дифенгидрамина, гидроксизина, метоклопрамида, лоразепама, алпразолама, галоперидола, дроперидола, дронабинола, дексаметазона, метилпреднизолона, прохлорперазина, гранисетрона, ондансетрона, доласетрона, трописетрона, пегфилграстима, эпоэтина альфа и дарбепоетина альфа, ипилумумаба, вемурафениба, ингибитора FLT-3, ингибитора VEGFR, ингибитора TK EGFR, ингибитора авророкиназы, модулятора PIK-1, ингибитора Bcl-2, ингибитора HDAC, ингибитора c-MET, ингибитора PARP, ингибитора Cdk, ингибитора TK EGFR, ингибитора IGFR-TK, антитела против HGF, ингибиторов киназы PI3, ингибитора mTOR, ингибитора AKT, ингибитора JAK/STAT, ингибитора контрольной точки 1 или 2, ингибитора киназы фокальной адгезии, ингибитора киназы Map-киназы (MEK), антитела-ловушки VEGF и их смесей.

В другом аспекте изобретение предоставляет способ лечения и/или профилактики пролиферативного и/или неопластического заболевания, который может включать стадию введения терапевтически активного количества соединения по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, человеку или животному, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте изобретение предоставляет способ ингибирования роста или дифференцировки раковой стволовой клетки (CSC), опухоль-инициирующей клетки, мезенхимально-подобной клетки, связанной с раком, мезенхимальной раковой клетки или мезенхимальной клетки, который может включать стадию введения терапевтически активного количества соединения по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, человеку или животному, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет соединение для лечения и/или профилактики пролиферативного и/или неопластического заболевания.

В другом аспекте изобретение предоставляет соединение для ингибирования роста или дифференцировки раковой стволовой клетки (CSC), опухоль-инициирующей клетки, мезенхимально-подобной

клетки, связанной с раком, мезенхимальной раковой клетки или мезенхимальной клетки.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Вышеупомянутые и другие характеристики и преимущества изобретения станут более очевидными из следующих примеров и со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

**Фигура 1** демонстрирует уменьшение популяции клеток с ALDH<sup>+</sup> в клетках, полученных от пациентов с CRC (CPR19, CPR30 и CPR45), при воздействии соединением **2-3** (анализ Aldefluor<sup>TM</sup>);

**Фигура 2** демонстрирует ингибирование соединением **2-3** образования опухолевых сфер из клеток, полученных от пациентов с метастазирующим в печень раком толстой кишки (CRC);

**Фигура 3** демонстрирует спектр <sup>1</sup>H ЯМР соединения **1-6** в DMSO-*d*<sub>6</sub>;

**Фигура 4** демонстрирует спектр <sup>1</sup>H-ЯМР соединения **2-3** в DMSO-*d*<sub>6</sub>;

**Фигура 5** демонстрирует спектр <sup>1</sup>H ЯМР соединения **3-5** в DMSO-*d*<sub>6</sub>;

**Фигура 6** демонстрирует спектр <sup>1</sup>H ЯМР соединения **4-3** в DMSO-*d*<sub>6</sub>;

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем описании термин "алкил", сам по себе или в сочетании с другими группами, относится к одновалентному насыщенному алифатическому углеводородному радикалу с разветвленной или линейной цепью из одного до двадцати атомов углерода, предпочтительно из одного до шестнадцати атомов углерода, более предпочтительно из одного до десяти атомов углерода.

Термин "низший алкил", сам по себе или в комбинации, означает алкильную группу с линейной цепью или разветвленной цепью с 1-6 атомами углерода ("C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил"), предпочтительно алкильную группу с линейной или разветвленной цепью с 1-5 атомами углерода ("C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-алкил"), и особенно предпочтительно алкильную группу с линейной или разветвленной цепью с 1-3 атомами углерода ("C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил"). Примерами низших алкильных

групп с линейной или разветвленной цепью являются метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, *трет*-бутил, изомерные пентилы, изомерные гексилы, предпочтительно метил и этил, и пропил, и изопропил, и наиболее предпочтителен метил.

Термин "низший алкокси" относится к группе  $R'-O-$ , где  $R'$  представляет собой низший алкил, и термин "низший алкил" имеет ранее данное значение. Примерами низших алкоксигрупп являются метокси, этокси, *н*-пропокси, изопропокси, *н*-бутокси, изобутокси, *втор*-бутокси и *трет*-бутокси, предпочтительно метокси и этокси, и изопропокси, и *трет*-бутокси, наиболее предпочтительны метокси и этокси.

Термин "низший алкенил" означает углеводородный остаток с линейной цепью или разветвленной цепью, содержащий олефиновую связь и от 2 до 6 атомов углерода (" $C_2-C_6$ -алкенил"), предпочтительно от 2 до 5 атомов углерода (" $C_2-C_5$ -алкенил"), особенно предпочтительно от 2 до 4 атомов углерода (" $C_2-C_4$ -алкенил"). Примерами низших алкенильных групп являются этенил, 1-пропенил, 2-пропенил, изопропенил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, изопентенил. Предпочтительными примерами являются 2-пропенил, 2-бутенил и изопентенил.

Термин "низший алкинил" означает углеводородный остаток с линейной цепью или разветвленной цепью, содержащий алкиновую связь и от 2 до 6 атомов углерода (" $C_2-C_6$ -алкинил"), предпочтительно от 2 до 5 атомов углерода (" $C_2-C_5$ -алкинил"), особенно предпочтительно от 2 до 4 атомов углерода (" $C_2-C_4$ -алкинил"). Примерами алкинильных групп являются этинил, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-бутинил, 3-бутинил, 4-бутинил, 1-бут-2-ин, 1-пентинил, пент-2-ин-1-ил, пент-3-ин-1-ил, пент-4-ин-1-ил, пент-2-ин-3-ил. Предпочтительными примерами являются пропин-1-ил, пропин-3-ил, бутин-1-ил, бутин-3-ил, бутин-4-ил, бут-2-ин-1-ил.

Термин "галоген" относится к фтору, хлору, бром и йоду, причем предпочтительными являются фтор, хлор и бром.

Термин "циклоалкил" означает насыщенную карбоциклическую группу, содержащую от 3 до 7 атомов углерода (" $C_3-C_7$ -

циклоалкил"), такую как циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил или циклогептил. Предпочтительными циклоалкилами являются циклопропил, циклопентил и циклогексил.

Термин "гетероциклическая группа" означает полностью насыщенные или ненасыщенные, но не полностью ненасыщенные, например, 3-7-членные моноциклические группы или 7-11-членные конденсированные бициклические кольцевые системы, которые имеют, по меньшей мере, один гетероатом, выбранный из атома кислорода, атома азота или атома серы. Каждое кольцо гетероциклической группы может иметь, по меньшей мере, один гетероатом, выбранный из атомов азота, атомов кислорода и/или атомов серы. Предпочтительными гетероциклическими группами являются пирролидин, пиперидин, пиперазин, тетрагидрофуран, бис-тетрагидрофуран и морфолин.

Термин "карбоксил" означает группу  $\text{-COOH}$ .

Термин "гетероарил", как правило, относится к ароматическому 5- или 11-членному кольцу, которое содержит, по меньшей мере, один гетероатом и может дополнительно содержать один, два, три или четыре атома, выбранных из азота, кислорода и/или серы, такому как пиридил, пиазинил, пиримидинил, пиридазинил, 2-оксо-1,2-дигидропиридинил, оксадиазолил, изоксазолил, тиadiaзолил, триазолил, тетразолил, пиазолил, имидазолил, тиофенил, фуранил, оксазолил, изотиазолил и тиазолил. Термин "гетероарил" дополнительно относится к бициклическим ароматическим или частично ненасыщенным группам, содержащим два 5- или 6-членных кольца, в которых одно или оба кольца могут содержать один, два, три или четыре атома, выбранных из азота, кислорода или серы, таким как хинолинил, изохинолинил, циннолинил, пиазолил, имидазолил, тиазолил, тиофенил, фуранил, оксазолил, изотиазолил, пиазоло[1,5-а]пиридил, имидазо[1,2-а]пиридил, хиноксалинил, хиназолил, бензотиазолил, бензотриазолил, 1Н-бензо[d]имидазол, бензо[d]изоксазолил, бензо[d]изотиазолил, бензо[c]изоксазолил, бензо[c]изотиазолил, индолил, изоиндолинил, 6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-б]пиридинил, 2,3-дигидро-1Н-пирроло[3,4-с]пиридинил, 6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-д]пиримидинил, пуринил, индазолил,

индолизинил, имидазо [1,2-а] пиридинил, имидазо [1,5-а] пиридинил, имидазо [1,5-а] пиазинил, имидазо [1,2-а] пиазинил, 1Н-имидазо [4,5-*b*] пиазинил, пиазоло [1,5-а] пиридинил, пирроло [1,2-а] пиримидинил, пирроло [1,2-а] пиазинил, пирроло [1,2-с] пиримидинил, оксазоло [4,5-*b*] пиридинил, оксазоло [4,5-с] пиридинил, оксазоло [5,4-с] пиридинил, оксазоло [5,4-*b*] пиридинил, тиазоло [4,5-*b*] пиридинил, тиазоло [4,5-с] пиридинил, тиазоло [5,4-с] пиридинил, тиазоло [5,4-*b*] пиридинил, оксазоло [5,4-*d*] пиримидинил, оксазоло [4,5-*d*] пиримидинил, тиазоло [5,4-*d*] пиримидинил, тиазоло [4,5-*d*] пиримидинил, оксазоло [4,5-*b*] пиазинил, тиазоло [4,5-*b*] пиазинил, изоксазоло [4,5-*b*] пиазинил, изотиазоло [4,5-*b*] пиазинил, изоксазоло [4,5-*d*] пиримидинил, изотиазоло [4,5-*d*] пиримидинил, изоксазоло [5,4-*d*] пиримидинил, изотиазоло [5,4-*d*] пиримидинил, изоксазоло [5,4-*b*] пиридинил, изотиазоло [5,4-с] пиримидинил, изоксазоло [5,4-с] пиридинил, изотиазоло [4,5-с] пиридинил, изоксазоло [4,5-с] пиридинил, изоксазоло [4,5-*b*] пиридинил, изоксазоло [4,3-*d*] пиримидинил, изотиазоло [4,3-*d*] пиримидинил, изоксазоло [3,4-*d*] пиримидинил, изотиазоло [3,4-*d*] пиримидинил, пиридо [2,3-*d*] пиримидинил, пиридо [3,4-*d*] пиримидинил, пиридо [4,3-*d*] пиримидинил, пиридо [3,2-*d*] пиримидинил, пиридо [2,3-*b*] пиазинил, пиридо [3,4-*b*] пиазинил, [1,2,3] триазоло [4,5-*b*] пиридинил, [1,2,3] триазоло [4,5-с] пиридинил, 3Н- [1,2,3] триазоло [4,5-*d*] пиримидинил. Предпочтительными гетероарильными группами являются пиридил, тиазолил, изотиазолил, оксазолил, изоксазолил, хинозолинил и пиазинил.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований или свободных кислот, которые не являются биологически или иным образом нежелательными. Соли образуют с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и тому подобное, предпочтительно хлористоводородная кислота, и органическими кислотами, такими как уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота,

малоновая кислота, салициловая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, глутаровая кислота, коричная кислота, миндальная кислота, яблочная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, N-ацетилцистеин и тому подобное. Кроме того, эти соли могут быть получены за счет присоединения неорганического основания или органического основания к свободной кислоте. Соли, полученные из неорганического основания, включают, но не ограничиваются ими, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция, магния и тому подобное. Соли, полученные из органических оснований, включают, но не ограничиваются ими, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклических аминов и основных ионообменных смол, таких как изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, лизин, аргинин, N-этилпиперидин, пиперидин, полиаминные смолы и тому подобное. Соединения формулы I могут также присутствовать в форме цвиттер-ионов.

Особенно предпочтительными фармацевтически приемлемыми солями соединений формулы I являются гидрохлоридные соли.

Соединения формулы I также могут быть сольватированы, например, гидратированы. Сольватация может быть осуществлена в ходе процесса получения или может иметь место, например, как следствие гигроскопических свойств первоначально безводного соединения формулы I или II (гидратация). Термин "фармацевтически приемлемые соли" также включает физиологически приемлемые сольваты.

"Изомеры" представляют собой соединения, которые имеют одинаковые молекулярные формулы, но которые различаются по природе или последовательности связывания их атомов или по расположению их атомов в пространстве. Изомеры, которые отличаются расположением их атомов в пространстве, называются "стереоизомерами". Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются

"диастереоизомерами", а стереоизомеры, которые являются несовпадающими при наложении зеркальными изображениями, называются "энантиомерами" или иногда оптическими изомерами.

В контексте настоящего описания термины "субъект" или "пациент" используются взаимозаменяемо. В контексте настоящего описания термины "субъект" и "субъекты" относятся к животному (например, к птицам, рептилиям и млекопитающим), предпочтительно к млекопитающим, включая неprimata (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу и мышь) и примата (например, обезьяну, шимпанзе и человека), и наиболее предпочтительно к человеку.

В контексте настоящего описания термины "терапевтические средства" и "терапия" могут относиться к любому протоколу (протоколам), способу (способам), композициям, составам и/или средству (средствам), которые могут быть использованы для профилактики, лечения или облегчения заболевания, включая вирусные или бактериальные инфекции или связанные с ними симптомы, раковые заболевания и т.д. В некоторых вариантах осуществления термины "терапевтические методы" и "терапия" относятся к биологической терапии, поддерживающей терапии и/или другим терапевтическим средствам, пригодным для лечения, сдерживания развития, профилактики или облегчения различных заболеваний, известных специалисту в данной области техники.

Термин "терапевтически эффективное количество" соединения означает количество соединения, которое является эффективным для предотвращения, облегчения или смягчения симптомов заболевания или продления выживания субъекта, подвергающегося лечению. Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники. Терапевтически эффективное количество или дозировка соединения по данному изобретению может варьироваться в широких пределах и может быть определена способом, известным в данной области техники. Такая дозировка будет корректироваться с учетом индивидуальных требований в каждом конкретном случае, включая конкретное соединение (соединения), которое вводится, способ введения, состояние, подвергаемое лечению, а также пациента,

которого подвергают лечению. Как правило, в случае перорального или парентерального введения взрослым людям массой приблизительно 70 кг суточная доза составляет от 0,1 до 5 г, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 г, более предпочтительно от 0,5 до 500 мг и наиболее предпочтительно от приблизительно 1 мг до 300 мг, хотя, если указано, верхний предел может быть превышен. Суточную дозу можно вводить в виде разовой дозы или в виде разделенных доз, или для парентерального введения ее можно вводить в виде непрерывной инфузии.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения любых и всех материалов, совместимых с фармацевтическим введением, включая растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, а также другие материалы и соединения, совместимые с фармацевтическим введением. За исключением тех случаев, когда любая обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, возможность использования их в композициях по изобретению рассматривается. В композиции могут быть также включены дополнительные активные соединения. Эти композиции могут быть получены путем применения известных в данной области техники методик, описанных в книгах *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (десятое издание) 2014, под редакцией Loyd Allen, Howard C. Ansel, издательство Wolters Kluwer Health и *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (двадцать второе издание) 2012, под редакцией Loyd V. Allen, издательство Pharmaceutical Press, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки.

В контексте настоящего описания термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся, в контексте введения терапевтического средства(средств) субъекту для лечения вирусной инфекции, к одному, двум, трем, четырем, пяти или более из следующих эффектов, возникающих в результате введения терапевтического средства или комбинации терапевтических средств: (i) ослабление

или облегчение тяжести заболевания и/или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания и/или связанного с ним симптома; (iii) регрессия заболевания и/или связанного с ним симптома; (iv) снижение титра возбудителя заболевания; (v) снижение выраженности органной недостаточности, связанной с заболеванием; (vi) уменьшение случаев госпитализации субъекта; (vii) сокращение продолжительности госпитализации; (viii) увеличение выживаемости субъекта; (ix) устранение инфекции; (X) ингибирование прогрессирования инфекции и/или связанного с ней симптома; (xi) предотвращение распространения вируса из клетки, ткани или субъекта в другую клетку, ткань или субъект; и/или (xii) усиление или улучшение терапевтического эффекта другого терапевтического средства.

"Пролекарство" означает соединение, которое подвергается превращению в соединение по изобретению внутри биологической системы. Пролекарство представляет собой химическое производное, неактивное или менее активное, чем само лекарство. После введения и диффузии в организме пролекарственное производное подвергается одному или нескольким метаболическим процессам, которые высвобождают активное лекарственное средство. Превращение пролекарства в лекарственное средство обычно осуществляют под контролем ферментативных процессов (обычно посредством метаболического пути, например, гидролиза, восстановления или окисления) и реже классическими химическими реакциями во время его диффузии в организме. Связующий мостик между носителем и лекарственным средством может представлять собой, но не ограничиваясь ими, сложный эфир, амид, карбонат, карбамат, имин, ацеталь, эфир (например, глюкоро-конъюгация), окисляемую функциональную группу и молекулярную систему, восстанавливаемую функциональную группу и восстанавливаемую молекулярную систему, фотоактивируемую функциональную группу и фотоактивируемую молекулярную систему. Например, сложноэфирное пролекарство соединения, содержащее гидроксильную группу, может быть превращено путем гидролиза *in vivo* в исходную молекулу. Подходящими сложными эфирами соединений по изобретению, содержащими гидроксильную группу, являются, например, ацетаты,

цитраты, лактаты, тартраты, малонаты, оксалаты, салицилаты, пропионаты, сукцинаты, фумараты, малеаты, метилен-бис- $\beta$ -гидроксинафтоаты, гестисаты, изетионаты, ди-п-толуилтартраты, метансульфонаты, этансульфонаты, бензолсульфонаты, п-толуолсульфонаты, циклогексилсульфаматы и хинаты. В качестве другого примера сложноэфирное пролекарство соединения по изобретению, содержащее карбоксигруппу, может быть превращено путем гидролиза *in vivo* в исходную молекулу (примеры сложноэфирных пролекарств описаны F.J. Leinweber, Drug Metab. Res. 1987, (18) pp379, включенной в настоящее описание посредством ссылки). Аналогично, ацильное пролекарство соединения, содержащее аминогруппу, может быть превращено путем гидролиза *in vivo* в исходную молекулу (примеры пролекарств для этих и других функциональных групп, включая амин, спирт, описаны в книгах *Prodrugs: Challenges and Rewards* (Части 1 и 2); Ed V. Stella, R. Borchardt с соавт., Springer, 2007, и *Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties* Ed. J. Rautio, Seies Ed. R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers. Wiley-VCH 2011, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки).

Система носителей пролекарства обычно используется для увеличения растворимости в воде или липидах, снижения токсичности, повышения химической и биологической стабильности чувствительного соединения, увеличения времени циркуляции в организме ( $T_{1/2}$ ), увеличения общей экспозиции лекарственного средства (AUC) и распределения по органам (определение ФК-ФД профиля) и сайт-специфического воздействия.

#### **Вещества и способы, относящиеся к примерам 1, 2, 3 и 4**

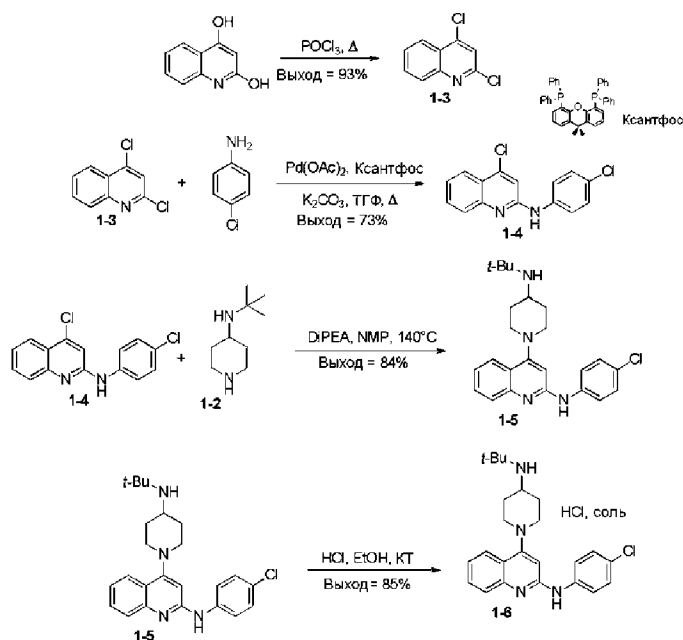
Реагенты и растворители получали от коммерческих поставщиков и использовали без дополнительной очистки. Сухой метиленхлорид сушили и перегоняли над  $\text{CaCl}_2$  и хранили над молекулярными ситами  $4\text{\AA}$  в атмосфере аргона. Тетрагидрофуран сушили над натрием/бензофенон-кетилем в атмосфере аргона и перегоняли перед использованием. Очистку флеш-хроматографией проводили на силикагеле Merck (40-63 мкм или 15-40 мкм) в

качестве неподвижной фазы.

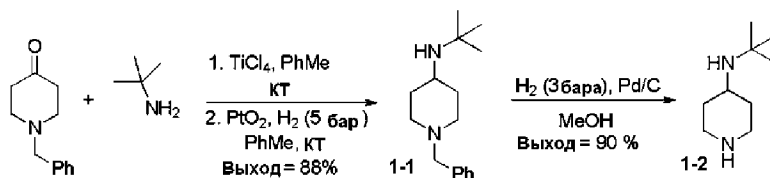
Спектры ЯМР регистрировали на Bruker Avance 300 МГц. Аналитическая ультравысокоэффективная жидкостная хроматография-масс-анализ (UHPLC-MS): UPLC Waters Acquity, UV DAD, соединенный с tandemным квадрупольным масс-спектрометром Waters Quattro Premier XE.

Колонка Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 50 мм) 1,7 мкм, подвижная фаза: А H<sub>2</sub>O+0,1% ТФУК, В: MeCN+0,1% ТФУК. Условия элюирования включали линейный градиент (минута/% В): 0/5% В, 4/98% В, скорость потока 0,4 мл/мин.

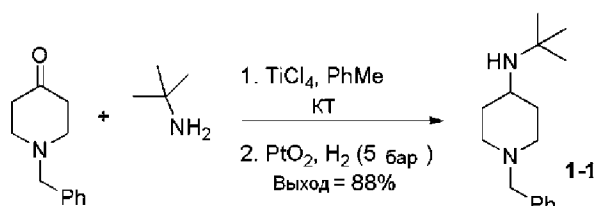
### 1. Пример 1: Получение гидрохлоридной соли 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (1-6).



#### Получение промежуточного 4-трет-бутиламинопиперидина (1-2):



#### 1.1. Синтез 1-бензил-4-трет-бутиламинопиперидина (1-1)

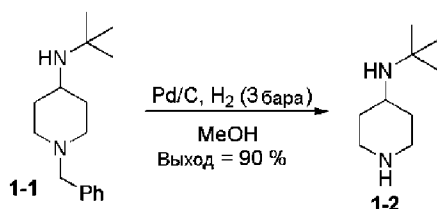


К раствору N-бензил-4-пиперидинона (60,0 г, 314 ммоль) в 500 мл сухого толуола и *трет*-бутиламина (135 мл, 1280 ммоль) добавляли по каплям при  $T < 15^{\circ}\text{C}$  раствор тетрахлорида титана (23,0 мл, 210 ммоль) в 250 мл сухого толуола. Полученную в результате смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч и затем фильтровали через слой Целита®. Тoluольный раствор переносили в реактор для гидрирования под высоким давлением и добавляли двуокись платины (160 мг, 0,70 ммоль). Водород вводили в реактор при давлении 5 бар, и реакцию проводили при комнатной температуре в течение 2 дней. Затем полученную в результате смесь разбавляли 2 М водным раствором NaOH (400 мл) и фильтровали через слой Целита®. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали толуолом. Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 68,05 г (выход 88%) оранжевого масла, соответствующего 1-бензил-4-*трет*-бутиламинопиперидину.

Масса: (ES+)  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2$  требуется 246; найдено 247 [M+H]

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )

### 1.2. Синтез 4-*трет*-бутиламинопиперидина (1-2)

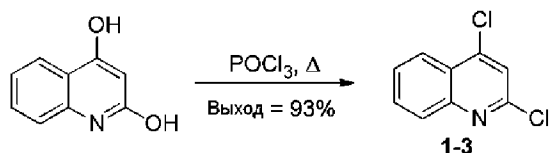


В водородном химическом реакторе к дегазированному азотом раствору 1-бензил-4-*трет*-бутиламинопиперидина (68,05 г, 276 ммоль) в 700 мл метанола добавляли порошок палладия на угле 10% масс., влажность 50% (29,40 г, 13,81 ммоль, 5% мол.) в атмосфере азота. Водород вводили в реактор при давлении 3 бара, и реакцию проводили при комнатной температуре в течение 2 дней. Затем полученную смесь фильтровали через слой Целита®, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 38,86 г (выход 90%) желтого твердого вещества, соответствующего 4-*трет*-бутиламинопиперидину.

Масса: (ES+)  $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_2$  требуется 156; найдено 157 [M+H]

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )

### 1.3. Синтез 2,4-дихлорхинолина (1-3)

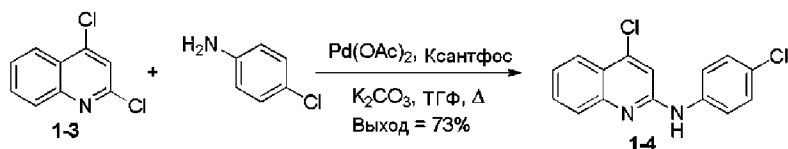


К хинолин-2,4-диолу (50,0 г, 310 ммоль) добавляли по каплям фосфорилхлорид (250 мл, 2682 ммоль) при 0°C. Полученную в результате смесь перемешивали и кипятили с обратным холодильником в течение ночи. Затем смесь охлаждали, концентрировали при пониженном давлении и дважды совместно упаривали с 500 мл толуола. Остаток затем обрабатывали с помощью ДХМ (500 мл) и промывали холодной водой. Водный слой экстрагировали с помощью ДХМ, и объединенные органические слои объединяли и сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества (57,0 г, выход 93%), соответствующего 2,4-дихлорхинолину.

Масса: (ES+)  $\text{C}_9\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N}$  требуется 197; найдено 198 [M+H]

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )

### 1.4. Синтез 2-(4-хлорфениламино)-4-хлорхинолина (1-4)



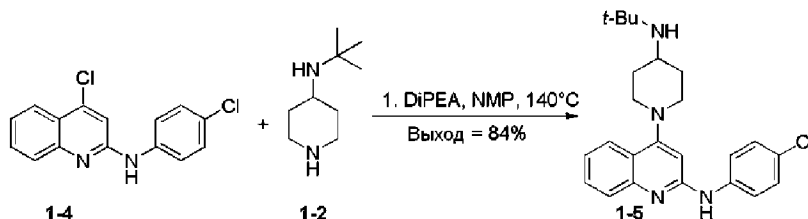
К раствору 2,4-дихлорхинолина (2,00 г, 10,1 ммоль) в сухом ТГФ (20 мл) в атмосфере азота добавляли 4-хлоранилин (1,45 г, 11,1 ммоль) и  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3,91 г, 28,3 ммоль). Полученную в результате смесь дегазировали 5 мин с помощью азота, затем добавляли Ксантфос (590 мг, 1,01 ммоль) и  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (120 мг, 0,5 ммоль), и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между водой и  $\text{AcOEt}$ , и водный слой экстрагировали с помощью  $\text{AcOEt}$ . Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением желтого масла. Сырой продукт очищали с помощью флеш-хроматографии (градиент циклогексан/ $\text{AcOEt}$  от 7/3 до 0/10) с получением 2,13 г (выход 73%) желтого твердого вещества,

соответствующего 2-(4-хлорфениламино)-4-хлорхинолину.

Масса: (ES+)  $C_{15}H_{10}Cl_2N_2$ , требуется 288; найдено 289 [M+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )

**1.5. Синтез 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (1-5)**

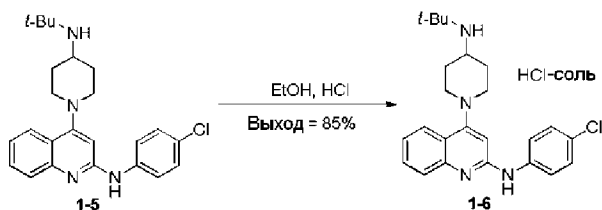


К раствору 2-(4-хлорфениламино)-4-хлорхинолина (1,00 г, 3,46 ммоль) и 4-(трет-бутиламино)-пиперидина (684 мг, 4,38 ммоль) в 5 мл NMP добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,947 мл, 5,47 ммоль), и смесь нагревали в течение 24 ч при 140°C. Затем реакционную смесь охлаждали, разбавляли 1 н водным раствором NaOH, и полученную в результате смесь экстрагировали с помощью AcOEt. Объединенные органические слои сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением коричневой жидкости. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (градиент циклогексан/AcOEt от 8/2 до 2/8) с получением желтоватого твердого вещества. Это твердое вещество перекристаллизовывали из MeCN с получением 1,19 г (выход 84%) белого твердого вещества, соответствующего 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолину.

ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}=1,24$  мин, (ES+)  $C_{24}H_{29}ClN_4$  требуется 408; найдено 409 [M+H], 353 [M-tBu+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )

**1.6. Синтез гидрохлоридной соли 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (1-6)**



К суспензии 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (440 мг, 1,1 ммоль) в 4 мл

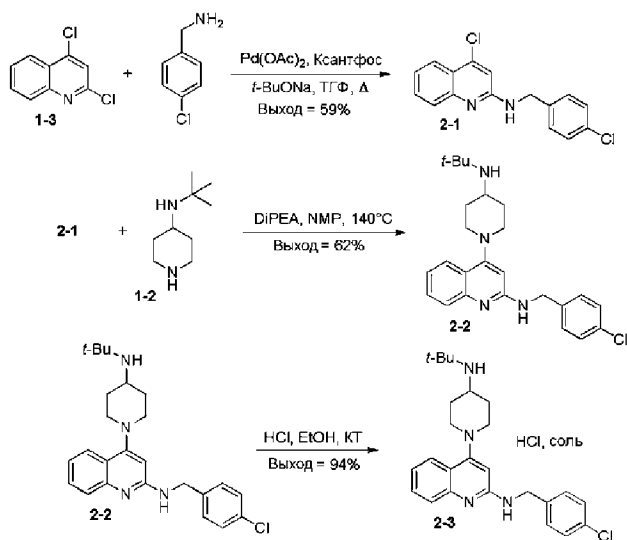
EtOH добавляли по каплям 371 мкл 7,25 М раствора HCl в EtOH. Твердое вещество растворялось, и смесь перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем полученный в результате раствор концентрировали примерно до половины объема при пониженном давлении и добавляли 6 мл эфира. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре, получая белое твердое вещество, которое отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме при 45°C с получением 401 мг (выход 85%) белого твердого вещества, соответствующего гидрохлоридной соли 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина.

ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}=1,21$  мин, (ES+)  $C_{24}H_{29}ClN_4$  требуется 408; найдено 409 [M+H], 353 [M-tBu+H]

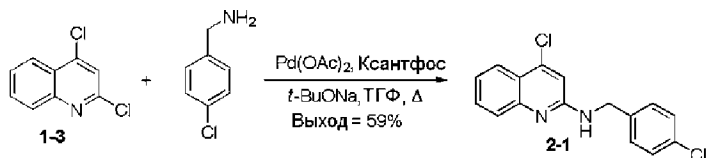
$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CD_3OD$ )

$^{13}C$  ЯМР (75 МГц,  $CD_3OD$ )

## 2. Пример 2. Получение гидрохлоридной соли 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (2-3)



### 2.1. Синтез 2-(4-хлорбензиламино)-4-хлорхинолина (2-1)



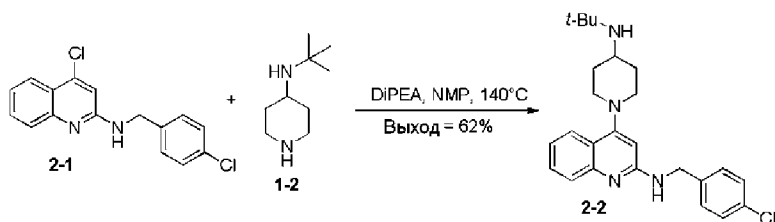
К раствору 2,4-дихлорхинолина (1,00 г, 5,05 ммоль) в сухом ТГФ (10 мл) в атмосфере азота добавляли 4-хлорбензиламин (1,46

г, 10,1 ммоль) и  $t\text{-BuONa}$  (1,36 г, 14,1 ммоль). Полученную в результате смесь дегазировали в течение 5 мин с помощью азота, затем добавляли Ксантафос (295 мг, 0,51 ммоль) и  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (58 мг, 0,25 ммоль), и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между насыщенным раствором соли и  $\text{AcOEt}$ , и водный слой экстрагировали с помощью  $\text{AcOEt}$ . Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением коричневого масла. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (градиент циклогексан/ДХМ от 5/5 до 0/10) с получением 897 мг (выход 59%) коричневого твердого вещества, соответствующего 2-(4-хлорбензиламино)-4-хлорхинолину.

Масс-спектр: (ES+)  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2$  требуется 302; найдено 303 [M+H]

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )

## 2.2. Синтез 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (2-2)



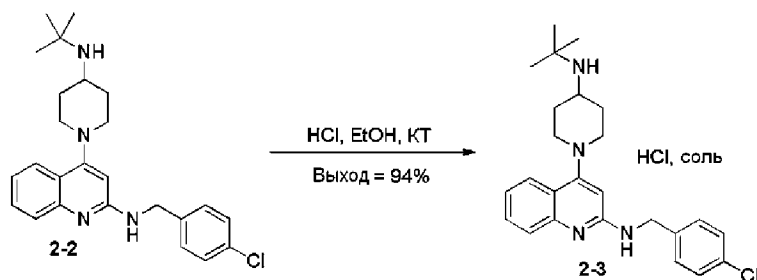
К раствору 2-(4-хлорбензиламино)-4-хлорхинолина (1,05 г, 3,46 ммоль) и 4-(трет-бутиламино)-пиперидина (0,684 г, 4,38 ммоль) в 5 мл NMP добавляли  $N,N$ -диизопропилэтиламин (0,947 мл, 5,47 ммоль), и смесь нагревали в течение 22 ч при 140°C. Затем реакционную смесь охлаждали, разбавляли 1 н водным раствором  $\text{NaOH}$ , и полученную в результате смесь экстрагировали с помощью  $\text{AcOEt}$ . Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением желтого масла. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (градиент циклогексан/ $\text{AcOEt}$  от 8/2 до 0/10) с получением желтого твердого вещества. Это твердое вещество перекристаллизовывали из  $\text{MeCN}$  с получением 904 мг (выход 62%)

белого твердого вещества, соответствующего 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолину.

ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}=1,30$  мин, (ES+)  $C_{25}H_{31}ClN_4$  требуется 422; найдено 423 [M+H], 368 [M-*t*Bu+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )

### 2.3. Синтез гидрохлоридной соли 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (2-3)

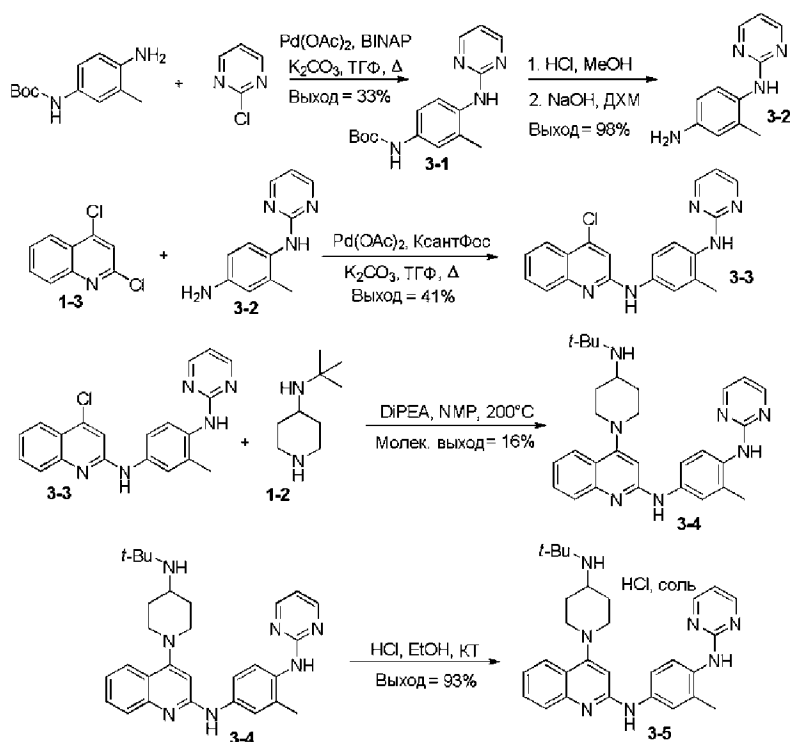


К суспензии 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (450 мг, 1,06 ммоль) в 2,5 мл EtOH добавляли по каплям 400 мкл 7 М раствора HCl в EtOH. Твердое вещество растворялось, и смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем полученный раствор концентрировали при пониженном давлении и добавляли эфир. Полученную в результате смесь перемешивали и растирали при комнатной температуре с получением желтоватого твердого вещества, которое отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Желтоватое твердое вещество растворяли в чистой воде и затем лиофилизировали с получением 401 мг (выход 94%) белого твердого вещества, соответствующего гидрохлоридной соли 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина.

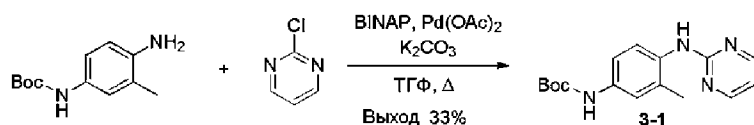
ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}=1,31$  мин, (ES+)  $C_{25}H_{31}ClN_4$  требуется 422; найдено 423 [M+H], 369 [M-*t*Bu+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $DMCO-d_6$ )

### 3. Пример 3: Получение гидрохлоридной соли 2-[3-метил-4-(пиримидин-2-иламино)фениламино]-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (3-5)



### 3.1. Синтез 2-метил- $N^1$ -(пиридин-2-ил)- $N^4$ -(трет-бутилоксикарбонил)-бензол-1,4-диамина (3-1)



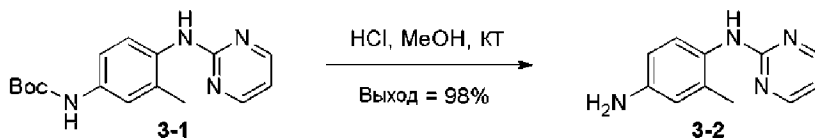
Раствор 2-метил- $N^4$ -(трет-бутилоксикарбонил)-бензол-1,4-диамина (2,40 г, 10,8 ммоль), 2-хлорпиридина (0,78 г, 6,5 ммоль) и  $K_2CO_3$  (2,24 г, 16,2 ммоль) в сухом ТГФ (48 мл) дегазировали с помощью азота в течение 15 минут. Затем добавляли  $Pd(OAc)_2$  (58 мг, 0,26 ммоль) и лиганд BINAP (320 мг, 0,52 ммоль), и реакционную смесь второй раз дегазировали в течение 20 минут. По завершении реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1 часа. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между водой и  $AcOEt$ , и водный слой экстрагировали с помощью  $AcOEt$ . Объединенные органические слои сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (градиент циклогексан/ $AcOEt$  от 10/0 до 7/3) с получением 650 мг (выход 33%) коричневого твердого вещества, соответствующего 2-метил- $N^1$ -(пиридин-2-ил)- $N^4$ -(трет-

бутилоксикарбонил)-бензол-1,4-диамина.

ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}=2,06$  мин, (ES+)  $C_{16}H_{20}N_4O_2$  требуется 300; найдено 301 [M+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CD_3OD$ )

### 3.2. Синтез 2-метил-N1-(пиримидин-2-ил)-бензол-1,4-диамина (3-2)

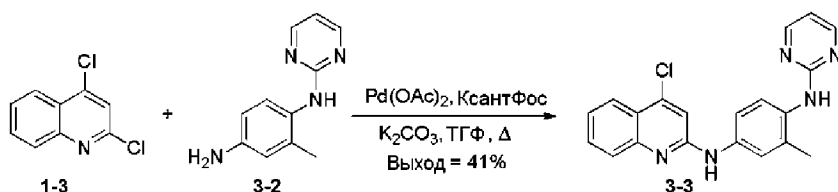


К 2-метил-N<sup>1</sup>-(пиримидин-2-ил)-N<sup>4</sup>-(трет-бутилоксикарбонил)-бензол-1,4-диамина (1,18 г, 3,93 ммоль) добавляли по каплям при комнатной температуре раствор 3 М HCl в метаноле (15 мл). Затем реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь затем концентрировали при пониженном давлении, и остаток распределяли между ДХМ и 1 М водным раствором NaOH, и водный слой экстрагировали с помощью ДХМ. Объединенные органические слои сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 787 мг (выход 98%) желтого масла, соответствующего 2-метил-N<sup>1</sup>-(пиримидин-2-ил)бензол-1,4-диамина.

Масса: (ES+)  $C_{11}H_{12}N_4$  требуется 200; найдено 201 [M+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CD_3OD$ )

### 3.3. Синтез 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-хлорхинолина (3-3)

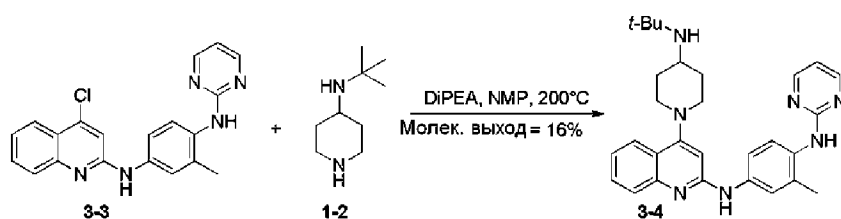


Раствор 2-метил-N<sup>1</sup>-(пиримидин-2-ил)бензол-1,4-диамина (771 мг, 3,85 ммоль), 2,4-дихлорхинолина (693 мг, 3,5 ммоль) и  $K_2CO_3$  (1,35 г, Ммоль) в сухом ТГФ (7 мл) дегазировали с помощью азота в течение 20 минут. Затем добавляли  $Pd(OAc)_2$  (47 мг, 0,21 ммоль) и лиганд КсантФос (61 мг, 0,10 ммоль), и реакционную смесь второй раз дегазировали в течение 20 минут. По завершении реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 4 часов.

Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между водой и AcOEt, и водный слой экстрагировали с помощью AcOEt. Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (градиент циклогексан/AcOEt от 10/0 до 5/5) с получением 520 мг (выход 41%) желтого твердого вещества, соответствующего 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-хлорхинолину.

Масса: (ES+) C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub> требуется 361; найдено 362 [M+H]

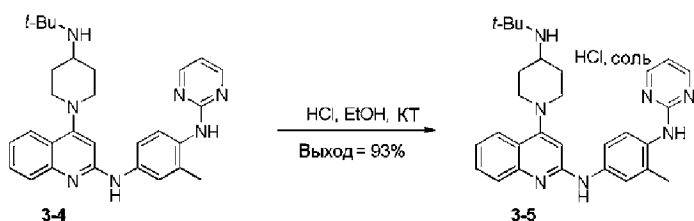
#### 3.4. Синтез 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (3-4)



К раствору 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-хлорхинолина (350 мг, 0,97 ммоль) в NMP (1,5 мл) добавляли 4-трет-бутиламинопиперидин (760 мг, 4,80 ммоль). Полученный раствор нагревали в течение 30 минут при 200°C в лабораторной микроволновой печи. Затем полученную в результате смесь охлаждали и распределяли между водой и AcOEt, и водный слой экстрагировали с помощью AcOEt. Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (градиент циклогексан/AcOEt от 10/0 до 5/5) с получением 75 мг (выход 16%) коричневого твердого вещества, соответствующего 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолину.

ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}$ =1,15 мин, (ES+) C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>, требуется 481; найдено 482 [M+H], 426 [M-tBu+H]

#### 3.5. Синтез гидрохлоридной соли 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (3-5)

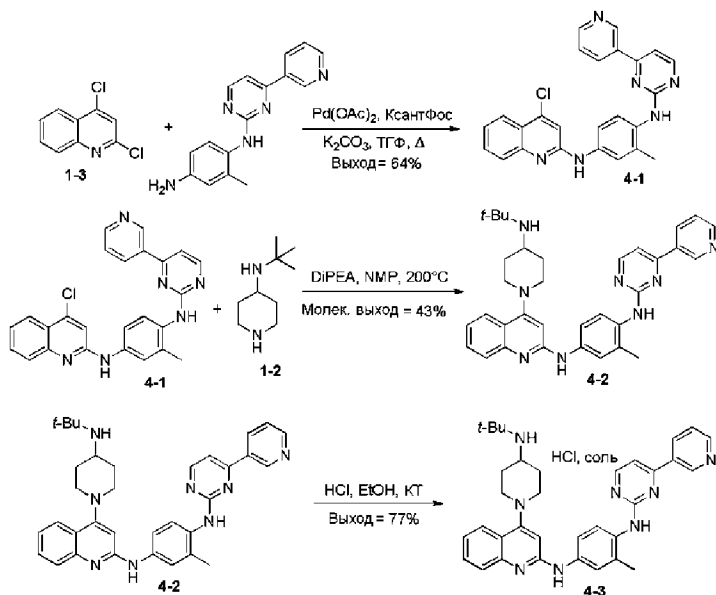


3,0 М раствор HCl в EtOH (290 мкл) добавляли по каплям к 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-(4-*tert*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолину (75 мг, 0,16 ммоль). Полученную в результате смесь фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением 80 мг (выход 93%) желтоватого твердого вещества, соответствующего гидрохлоридной соли 2-[4-(2-пиримидиниламино)-3-метил-фениламино]-4-(4-*tert*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина.

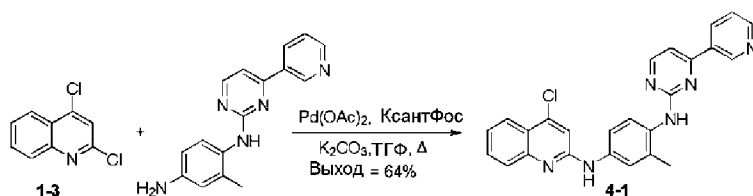
ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.} = 1,15$  мин, (ES+)  $C_{29}H_{35}N_7$ , требуется 481; найдено 482 [M+H], 426 [M-*t*Bu+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CD_3OD$ +несколько капель  $DMSO-d_6$ )

#### 4. Пример 4. Получение гидрохлоридной соли 2-[3-метил-4-(пиримидин-2-иламино)фениламино]-4-(4-*tert*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (4-3)



##### 4.1. Синтез 2-[4-[4-(пиримидин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино]-4-хлорхинолина (4-1)

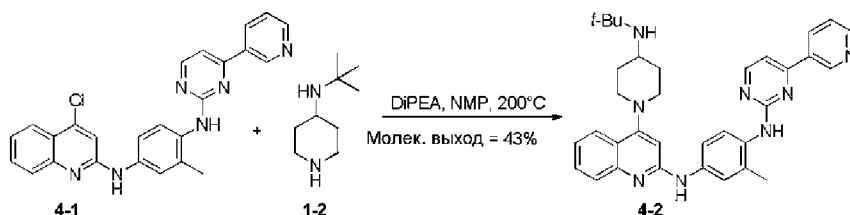


К раствору 2-метил- $N^1$ -[4-(пиридин-3-ил)-пиримидин-2-ил]бензол-1,4-диамина (1,18 г, 4,26 ммоль), 2,4-дихлорхинолина (767 мг, 3,87 ммоль) в сухом ТГФ (11,9 мл) добавляли  $K_2CO_3$  (2,7 г, 19,0 ммоль), и реакционную смесь дегазировали с помощью азота в течение 15 минут. Затем добавляли лиганд Ксантифос (226 мг, 0,387 ммоль) и  $Pd(OAc)_2$  (44 мг, 0,19 ммоль), и реакционную смесь второй раз дегазировали в течение 15 минут. По завершении реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между водой и  $AcOEt$ , и водный слой экстрагировали с помощью  $AcOEt$ . Объединенные органические слои сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (градиент циклогексан/ $AcOEt$  от 10/0 до 0/10) с получением 1,08 г (выход 64%) коричневого твердого вещества, соответствующего 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-хлорхинолину.

Масса: (ES+)  $C_{25}H_{19}ClN_6$  требуется 438; найдено 439 [M+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц,  $CD_3OD$ )

**4.2. Синтез 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-трет-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (4-2)**



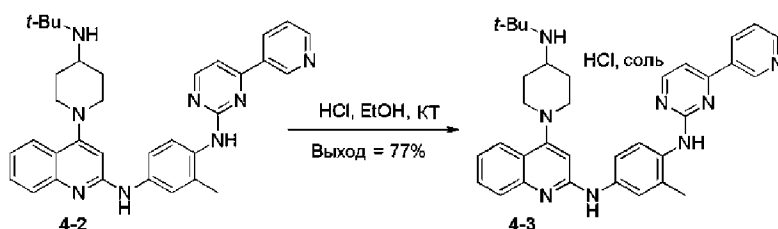
К раствору 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-хлорхинолина (1,0 г, 2,28 ммоль) в NMP (10 мл) добавляли 4-трет-бутиламинопиперидин (1,8 г, 11,0 ммоль). Полученный раствор нагревали в течение 90 минут при 200°C в лабораторной микроволновой печи. Полученную в результате смесь распределяли между водой и  $AcOEt$ , и водный слой экстрагировали с помощью  $AcOEt$ . Объединенные органические слои сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Сырой

продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (от AcOEt/ДХМ 3/2, затем ДХМ/MeOH 9/1), получая 1,01 г желтого твердого вещества, которое перекристаллизовывали из EtOH с получением 550 мг (выход 43%) белого твердого вещества, соответствующего 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*tert*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолину.

ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}=1,20$  мин, (ES+)  $C_{34}H_{38}N_8$  требуется 558; найдено 559 [M+H], 503 [M-tBu+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц, DMSO- $d_6$ )

**4.3. Синтез гидрохлоридной соли 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*tert*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (4-3)**



К суспензии 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*tert*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина в EtOH (5,5 мл) добавляли по каплям 3,0 М раствор HCl в EtOH (4 мл). Образовавшееся желтое твердое вещество отфильтровывали и затем растирали с циклогексаном. Суспензию отфильтровывали с получением 505 мг (выход 77%) белого твердого вещества, соответствующего гидрохлоридной соли 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*tert*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина.

ВЭЖХ-МС:  $t_{уд.}=1,22$  мин, (ES+)  $C_{34}H_{38}N_8$  требуется 558; найдено 559 [M+H], 503 [M-tBu+H]

$^1H$  ЯМР (300 МГц, CD<sub>3</sub>OD+несколько капель DMSO- $d_6$ )  $^{13}C$  ЯМР (125 МГц, CD<sub>3</sub>OD)

**5. Пример 5: Профиль активности соединений 1-6, 2-3, 3-5 и 4-3 в клеточных линиях MOLM-14, KG-1, MV4-11, A375, HCT-116, HepG2, Huh-7, MRC-5, MDA-MB-231, ARPE-19 и клетках PBMC**

Клеточная культура: Все клеточные линии поддерживали в среде, содержащей 1% пенициллина-стрептомицина (Dutscher, P06-07100) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, W3387L), за

исключением 20% для клеточной линии KG-1 и PBMC, и культивировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

Клеточные линии HepG2, Huh7, HCT-116, MDA-MB-231 и A375 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (Dutscher, L0103).

Клеточные линии KG-1 и MV4-11 поддерживали в модифицированной Исковым среде Дульбекко (Dutscher, L0190).

Клеточную линию MOLM-14 поддерживали в среде альфа-MEM (Gibco, 22561-021).

PBMC поддерживали в среде RPMI 1640 (Dutscher, L0498).

Клеточную линию MRC-5 поддерживали в MEM (Dutscher, L0416).

Клеточную линию ARPE-19 культивировали в среде DMEM:F12 (Dutscher, L0093).

Анализ жизнеспособности клеток: Жизнеспособность клеток измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, как описано производителем (Promega, Ref G7571), с использованием люминометра Infinite F200Pro (Tecan). Вкратце, для адгезивных клеток клетки высевали на 96-луночные планшеты (белые с прозрачным дном) в 90 мкл среды на лунку и им позволяли расти в течение ночи перед анализом. Для клеток, растущих в суспензии, клетки высевали на 96-луночные планшеты непосредственно перед анализом. Количество клеток, посеянных на лунку, указано в нижеприведенной таблице 1:

**Таблица 1: Количество клеток, посеянных на лунку для анализа жизнеспособности клеток**

| Пункт | Клеточные линии | Количество клеток на лунку |
|-------|-----------------|----------------------------|
| 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                      |

Соединения добавляли в разных концентрациях в каждую лунку

и культуры клеток инкубировали в течение 72 часов. Растворитель ( $H_2O$ ) использовали в качестве контроля, и все соединения испытывали при постоянном процентном содержании  $H_2O$ . После добавления 100 мкл CellTiter-Glo® люминесценцию измеряли с использованием Infinite F200Pro (Tecan). Величины  $EC_{50}$  определяли как дозу соединения, необходимую для снижения значений люминесценции до 50% сигнала, полученного для необработанных клеточных культур. Экспериментальные данные анализировали с использованием компьютерной программы Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Калифорния).

Все эксперименты проводили, как минимум, в двух повторностях и повторяли независимо два раза.

**Таблица 2:** Анализ клеточной линии MOLM-14 на ингибирование роста в присутствии соединений 1-6, 2-3, 3-5, 4-3

| Соединения | Жизнеспособность клеток клеточной линии 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   |

**Таблица 3:** Анализ клеточных линий MOLM-14, KG-1, MV4-11 и РВМС по ингибированию роста в присутствии соединения 2-3

| Клетки                      | MOLM-14                                                       | KG-1                                                             | MV4-11                                                                            | PBMC                                       |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Качественная характеристика | Острая миелоидная лейкоemia<br>Гетерозиготная по FLT3-ITD +/- | Острая миелогенная лейкоemia<br>FLT3-ITD WT -/-<br>слияния FGFR1 | В-бифенотипическая миеломоноцитарная лейкоemia<br>Гомозиготная по FLT3-ITD<br>+/+ | Мононуклеарные клетки периферической крови |
| EC <sub>50</sub> (мкМ)      | 2,2                                                           | 5,1                                                              | 2,3                                                                               | 1,9                                        |

**Таблица 4:** Анализ клеточных линий A375, HCT-116, HepG2 и Huh-7 на ингибирование роста в присутствии соединения 2-3

| Клеточные линии             | A375                     | HCT-116                  | HepG2                       | Huh-7                       |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Качественная характеристика | Злокачественная меланома | Колоректальная карцинома | Гепатоцеллюлярная карцинома | Гепатоцеллюлярная карцинома |
| EC <sub>50</sub> (мкМ)      | 1,0                      | 1,6                      | 0,9                         | 1,7                         |

**Таблица 5:** Анализ клеточных линий MRC-5, MDA-MB-231 и ARPE-19 на ингибирование роста в присутствии соединения 2-3

| Клеточные линии             | MRC-5                                     | MDA-MB-231           | ARPE-19                                      |
|-----------------------------|-------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------|
| Качественная характеристика | Человеческий фетальный фибропласт легкого | Аденокарцинома груди | Человеческий ретинальный пигментный эпителий |
| EC <sub>50</sub> (мкМ)      | ≈3,4                                      | 2,0                  | ≈6,9                                         |

**Таблица 6:** Анализ клеточных линий MOLM-14, A375, HCT-116 и HepG2 на ингибирование роста в присутствии соединения 4-3

| Клеточные линии             | MOLM-14                     | A375                     | HCT-116                  | HepG2                       |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Качественная характеристика | Острая миелоидная лейкоemia | Злокачественная меланома | Колоректальная карцинома | Гепатоцеллюлярная карцинома |
| EC <sub>50</sub> (мкМ)      | 2,3                         | 1,4                      | 1,8                      | 6,3                         |

## **6. Пример 6: Анализ компартмента с ALDH+ в клеточной линии MOLM-14**

Клеточную линию MOLM-14 культивировали в среде альфа-МЕМ с добавлением 10% об./об. фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина-стрептомицина и поддерживали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. 10000 клеток высевали на 96-луночные планшеты непосредственно перед анализом.

Каждое соединение добавляли в разных концентрациях (комбинации шести концентраций) в каждую лунку, и культуры клеток инкубировали в течение 72 часов. Растворитель (H<sub>2</sub>O) использовали в качестве контроля, и все соединения испытывали при постоянном процентном содержании растворителя. Клеточный рост измеряли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, как описано производителем (Promega, Ref G7571 Мэдисон, Висконсин, США) с использованием планшет-ридера Centro (Berthold, Франция).

В каждом эксперименте каждая точка представляет собой среднее из трех повторностей в культуре клеток.

Экспериментальные данные анализировали с использованием компьютерной программы Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Калифорния), и значения EC<sub>50</sub> определяли как дозу соединения, необходимую для снижения значений оптической плотности до 50% сигнала, полученного для клеточных культур, обработанных растворителем.

Анализ компартмента с альдегиддегидрогеназой (ALDH) и высокий уровень альдегиддегидрогеназной активности (ALDH+) использовали для выявления популяций опухоль-инициирующих клеток (раковых стволовых клеток, CSC). Набор для анализа Aldefluor™ (StemCell Technologies, 01700) позволил оценить активность лекарственных средств на CSC-клетках, например, в популяции клеточной линии острой миелоидной лейкемии MOLM-14 (ссылка: 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). Набор для анализа Aldefluor™ использовали в соответствии с процедурой, описанной изготовителем. Вкратце, клеточную линию MOLM-14 культивировали в среде альфа-MEM с добавлением 10% об./об. фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина-стрептомицина и поддерживали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. В данном анализе использовали 5.10<sup>5</sup> клеток. Каждое соединение добавляли в различных концентрациях (см. таблицу 8), и культуры клеток инкубировали в течение 72 часов. Растворитель (H<sub>2</sub>O) использовали в качестве контроля, и все соединения испытывали при постоянном процентном содержании растворителя. Клетки, полученные из клеточной культуры, инкубировали в течение 45 минут при 37°C с буфером для анализа Aldefluor™, содержащим Bodipy™-аминоацетальдегид, флуоресцентный альдегидный субстрат ALDH. ALDH превращает флуоресцентный субстрат BAAA в Bodipy™-аминоуксусную кислоту (BAA), которая сохраняется в клетке. Ингибитор активного эффлюкса присутствует в буфере для анализа Adelfluor™, чтобы избежать активного эффлюкса из клетки продукта субстрата ALDH-зависимой превращенной BAA. Флуоресцентный сигнал прямо пропорционален активности ALDH в клетках и измеряется проточной цитометрией. Отрицательный контроль используют для измерения уровня фоновой флуоресценции. С этой целью в качестве селективного ингибитора ALDH использовали 4-(N,N-диэтиламино)-бензальдегид (DEAB). Расчет жизнеспособности клеток осуществляли, используя набор LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). Экспериментальные данные анализировали с использованием компьютерной программы Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Калифорния), и значения EC<sub>50</sub> определяли как дозу соединения, необходимую для снижения значений оптической плотности до 50% сигнала, полученного для клеточных культур, обработанных растворителем.

**Таблица 7: Анализ клеточной линии MOLM-14 на ингибирование роста в присутствии цитарабина и соединения 2-3**

| Соединения             | Цитарабин | 2-3 <sup>a</sup> |
|------------------------|-----------|------------------|
| EC <sub>50</sub> (мкМ) | 0,290     | 2,2              |

<sup>a</sup>: EC<sub>50</sub> получали способом, описанным в примере 5, см.

таблицу 3

**Таблица 8: Популяция ALDH уменьшается в клеточной линии MOLM-14 с помощью соединения 2-3, используя набор для анализа Aldefluor™**

| Соединения                       | Контроль | Цитарабин |       | 2-3     |         |         |
|----------------------------------|----------|-----------|-------|---------|---------|---------|
|                                  |          | 1 мкМ     | 3 мкМ | 2,5 мкМ | 5,0 мкМ | 7,5 мкМ |
| ALdefluor™-положительные CSC (%) | 100      | 130       | 116   | 100     | 80      | 20      |

**7. Пример 7: Анализ клеточной линии НерЗВ-Лус на ингибирование роста (EC<sub>50</sub>, мкМ) в присутствии соединения 2-3**

Перед обработкой соединением соединение растворяли в H<sub>2</sub>O, чтобы получить 10 мМ маточный раствор. Затем получали рабочие растворы (кратные 5 конечные концентрации) с использованием среды MEM (Gibco, 1128319), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, 10099141).

При проведении анализа в качестве внутреннего контроля для каждого аналитического планшета для анализа использовали проверку зависимости доза-ответ доксорубина на линии клеток BEL-7402 (человеческая первичная гепатоцеллюлярная карцинома). Среду MEM, дополненную 5% H<sub>2</sub>O (5×), добавляли в клетки в качестве отрицательного контроля. Конечная концентрация H<sub>2</sub>O составляла 1% в каждой лунке.

Клеточную линию НерЗВ-Лус (клеточная линия карциномы печени человека, трансфецированная люциферазой, для модели ортотопической опухоли) культивировали в среде MEM, дополненной 10% об./об. фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1% пенициллина-стрептомицина и поддерживали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. 800 клеток высевали на 384-луночный белый планшет с плоским прозрачным дном (Corning, 3707).

Аналитическая методика: Клетки в логарифмической фазе роста собирали и подсчитывали. Клеточные суспензии добавляют в каждую лунку 384-луночного планшета из расчета 800 клеток на лунку (общий объем 40 мкл). Крайние лунки заполняют буфером PBS. Испытуемое соединение в различных концентрациях добавляют в двух повторностях (добавляют в планшет 10 мкл 5× растворов

соединений). Планшет инкубировали в течение 72 часов в инкубаторе с 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, как описано производителем (Promega, Ref G7571). После добавления 100 мкл реакционного раствора CellTiter-Glo®, люминесценцию измеряли с использованием люминометра PHERAstar Plus. Данные регистрировали PHERAstar Plus, сбор данных и анализ выполняли с использованием программы Microsoft Excel и программного обеспечения GraphPad Prism v.6.

**Таблица 9: Исследование клеточной линии Hep3B-Luc на ингибирование роста в присутствии соединения 2-3**

| Соединения             | Доксорубин | 2-3       |
|------------------------|------------|-----------|
| Клеточные линии        | BEL-7402   | Hep3B-Luc |
| EC <sub>50</sub> (мкМ) | 0,15       | 1,1       |

**8. Пример 8: Анализ клеточных линий САКI-1 и 786-О на ингибирование роста (EC<sub>50</sub>, мкМ) в присутствии соединения 2-3**

Клеточная культура: Клеточные линии САКI-1 и 786-О поддерживали в среде RPMI 1640 (Dutscher, L0498), содержащей 1% пенициллина-стрептомицина (Dutscher, P06-07100) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, W3387L) и культивировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

Измерения жизнеспособности клеток: Жизнеспособность клеток измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, как описано производителем (Promega, Ref G7571), с использованием люминометра Infinite F200Pro (Tecan). Вкратце, клетки высевали на 96-луночные планшеты (белые с прозрачным дном) в 90 мкл среды на лунку и позволяли расти в течение ночи перед анализом. Количество клеток, посеянных на лунку, указано в таблице ниже:

**Таблица 10: Количество посеянных клеток на лунку для анализов жизнеспособности клеток САКI-1 и 786-О**

|        | Количество клеток на лунку |
|--------|----------------------------|
| САКI-1 | 2250                       |
| 786-О  | 1250                       |

В каждую лунку добавляли соединение 2-3 и два референсных

соединения (Сорафениб и Сунитиниб) в разных концентрациях, и клеточные культуры инкубировали в течение 72 часов. Для анализа соединения 2-3 использовали  $H_2O$  в качестве отрицательного контроля (= необработанные), и все концентрации испытывали при постоянном процентном содержании  $H_2O$ . Для анализа Сорафениба и Сунитиниба использовали ДМСО в качестве отрицательного контроля (= необработанные), и все концентрации испытывали при постоянном процентном содержании ДМСО. Через 72 ч после инкубации соединений в каждую лунку добавляли 100 мкл CellTiter-Glo® и измеряли люминесценцию с использованием Infinite F200Pro (Tecan). Величины  $EC_{50}$  определяли как дозу соединения, необходимую для снижения значений люминесценции до 50% сигнала, полученного для необработанных клеточных культур. Экспериментальные данные анализировали с использованием компьютерной программы Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Калифорния). Все эксперименты проводили, по меньшей мере, в трех повторностях и повторяли независимо, по меньшей мере, три раза.

**Таблица 11: Анализ клеточной линии САКI-1 на ингибирование роста в присутствии соединения 2-3 и Сорафениба, Сунитиниба в качестве контроля**

| Соединения | $EC_{50}$ (мкМ) | Стандартное отклонение |
|------------|-----------------|------------------------|
| 2-3        | 1,4             | 0,1                    |
| Сорафениб  | 4,5             | 1,5                    |
| Сунитиниб  | 1,7             | 0,7                    |

**Таблица 12: Анализ клеточной линии 786-О на ингибирование роста в присутствии соединения 2-3 и Сорафениба, Сунитиниба в качестве контроля**

| Соединение | $EC_{50}$ (мкМ) | Стандартное отклонение |
|------------|-----------------|------------------------|
| 2-3        | 2,1             | 0,2                    |
| Сорафениб  | 6,8             | 1,7                    |
| Сунитиниб  | 6,0             | 1,1                    |

**9. Пример 9: Действие *in vitro* соединения 2-3 на клетки метастазирующего в печень рака толстой кишки и субпопуляцию стволовых клеток рака толстой кишки**

Цель данного исследования состояла в том, чтобы оценить *in vitro* цитотоксическую активность соединения 2-3 против клеток,

полученных от пациентов с метастазирующим в печень раком толстой кишки, свежевыделенных от пациентов, и более конкретно на субпопуляцию CSC. В настоящее время имеется немного способов для отслеживания CSC *in vitro*. Например, активность альдегиддегидрогеназы (ALDH) может быть использована в качестве маркера для идентификации раковых стволовых клеток человека при раке толстой кишки. Кроме того, CSC может быть обогащен культивированием клеток в суспензии в бессывороточной среде, дополненной факторами роста. В таких условиях только CSC вырастали в виде многоклеточных трехмерных клонов, называемых "опухолевыми сферами". Воспользовавшись способностью к образованию опухолевых сфер, мы можем затем оценить количество CSC в образце и, таким образом, оценить влияние указанной молекулы на способность CSC самовосстанавливаться.

#### ***Культура опухолевых клеток, полученная от пациентов***

Полученные от пациентов клетки метастазов печени (CPR19, 30, 36 и CPR45 – см. таблицу 1 для клинических описаний) поддерживали в полной DMEM (Gibco) с 10% FBS. Клетки получали из биопсий, предоставленных CHU-Caréméau (Ним, Франция) в рамках утвержденного протокола. Подписанные информированные согласия получали от пациентов до получения образцов в соответствии со всеми этическими и правовыми аспектами. Опухоли промывали, измельчали на фрагменты (<2 мм<sup>3</sup>) и расщепляли с помощью либазы H (0,26 ед./мл, Roche), ресуспендированной в Ассумах (Sigma-Aldrich). Спустя 2 часа при 37°C суспензию клеток фильтровали через сито 40 мкм для получения суспензии отдельных клеток и высевали в среду DMEM, дополненную FBS, глутамином, антибиотиками и несущественными аминокислотами. При образовании монослоя опухолевых клеток, полученных от пациента, клетки отделяли с использованием трипсина/ЭДТА и ресуспендировали в DMEM с 10% FBS (для адгезивных клеток) или среде M11 определенного состава (для образования сфер). Клетки культивировали в увлажненной атмосфере при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

#### ***Анализ токсичности in vitro***

Клетки высевали из расчета 10<sup>4</sup> клеток на лунку в P96-

луночные планшеты в DMEM с 10% FBS. Спустя 24 часа клетки обрабатывали соединением **2-3**, и жизнеспособность клеток оценивали через 72 ч после обработки люминесцентным анализом жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega). EC<sub>50</sub> рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v6 (Graphpad Software, Inc Ла-Хойя, Калифорния).

#### ***Анализ Aldefluor™ и сортировка клеток, активированных флуоресценцией (FACS)***

Анализ Aldefluor™ (Stem Cell Technologies, 01700) проводили в соответствии с инструкциями производителя (Stem Cell Technologies). ALDH<sup>положительные</sup>-клетки идентифицировали путем сравнения того же образца в присутствии или в отсутствие ингибитора ALDH, диэтиламинобензальдегида (DEAB). FACS-гейтирование активности ALDH устанавливали на уровне 0,1% в присутствии DEAB. Клетки анализировали с использованием MacsQuant, и анализировали данные с использованием программного обеспечения Cyflogic. Клетки CPP36 не использовали в этих анализах из-за их высокого профиля клеточной автофлуоресценции.

#### ***Анализы образования сфер***

Оценку клеток, образующих сферы, определяли после высевания 500 клеток/200 мкл на лунку в среде M11 в P96-луночные планшеты с ультра-низким связыванием (Corning). M11 представляет собой среду DMEM/F12 (1:1) (Gibco), дополненную N2, глутамином 3 мМ, глюкозой 0,6%, инсулином 4 мкг/мл (Sigma-Aldrich), hBasic-FGF 10 нг/мл (R&D Systems) и hEGF 20 нг/мл (R&D Systems). Размеры сфер, превышающие 50 мкм, посчитывали через 10 дней и представляли в виде количества сфер на область изображения. Клетки CPP45 не использовали в этих анализах из-за их неспособности образовывать опухолевые сферы.

#### ***Статистический анализ***

Для каждого эксперимента данные представлены в виде среднего значения S.E.M трех независимых экспериментов. Программное обеспечение GraphPad Prism v6 (Graphpad Software, Inc Ла-Хойя, Калифорния) использовали для анализа данных, т.е. для параметрических t-критериев Стьюдента.

**Таблица 13: Клинические характеристики пациента с раком толстой кишки**

|                        | CPP19                | CPP30                                  | CPP36                 | CPP45       |
|------------------------|----------------------|----------------------------------------|-----------------------|-------------|
| Половая принадлежность | М                    | М                                      | М                     | М           |
| Возраст                | 65                   | 69                                     | 81                    | 80          |
| Мутация                | KRAS                 | Отсутствует                            | KRAS                  | KRAS        |
| Классификация по TNM   | T3N2aM1              | TxNxM1                                 | T4N2bM1               | T3N1cM1     |
| Радиотерапия           | Отсутствует          | Отсутствует                            | Отсутствует           | Отсутствует |
| Химиотерапия           | Бевацизумаб, Фолфири | Бевацизумаб, Фолфокс, Фолфири, Кселокс | Бевацизумаб и Фолфири | Отсутствует |

**Оценка *in vitro* цитотоксичности соединения 2-3 на клетки, полученные от пациентов с метастазирующим в печень колоректальным раком (CRC)**

Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, как описано производителем (Promega, Ref G7571), использовали для определения цитотоксичности соединения 2-3 в клетках, полученных от пациентов с метастазирующим в печень CRC. Жизнеспособность клеток от необработанных контрольных клеток установлена на уровне 100%. Клетки сначала помещали при плотности 10000 клеток/100 мкл на лунку в P96-луночные планшеты и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 24 часов. Клетки затем инкубировали с растворителем (0,1% ДМСО, необработанные контрольные клетки) или увеличивая концентрацию соединения 2-3. После 72 часов инкубации в концентрации от 0,1 до 30 мкМ соединение 2-3 продемонстрировало дозозависимые цитотоксические активности против полученных от пациентов с CRC четырех различных типов клеток, зафиксированных из свежих биоптатов метастазов печени (таблица 14).

**Таблица 14: Анализ ингибирования роста клеток, полученных от пациентов с метастазирующим в печень CRC, в присутствии соединения 2-3**

| CRC ID                 | CPP19 | CPP30 | CPP36 | CPP45 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|
| EC <sub>50</sub> (мкМ) | 1,88  | 1,22  | 1,45  | 1,12  |

**Оценка *in vitro* соединения 2-3 на Aldefluor™-положительных клетках из числа клеток, полученных от пациентов с**

### **метастазирующим в печень CRC**

Клетки сначала высевали при плотности 250000 клеток/1000 мкл на лунку в Р96-луночные планшеты и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 24 часов. Клетки затем инкубировали с растворителем (0,1% ДМСО) или увеличивая концентрацию соединения **2-3** в течение 72 часов. Клетки трипсинизировали, собирали и промывали. Бесклеточные частицы и мертвые клетки исключали на основе низкого рассеивания света и положительного окрашивания мертвых клеток красителем Sytox Blue (Life Technologies) с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi biotec). Процент ALDH<sup>ярких</sup>-клеток затем определяли количественно, используя анализ Aldefluor™ (Stemcell Technologies, 01700). Для обеспечения точной идентификации ALDH-положительных клеток добавляли ингибитор ALDH, диэтиламинобензальдегид (DEAB). Когда применяли ингибитор ALDH, DEAB, флуоресценцию снижали (сдвигали влево) и рисовали гейт (ограниченную область клеток), чтобы определить верхний предел этих клеток. Этот гейт использовали для выбора ALDH-высокоокрашенной субпопуляции. Как показано, после 72 часов инкубации в концентрации от 1 до 3 мкМ соединение **2-3** демонстрирует значительные ( $p < 0,001$ ) и дозозависимые цитотоксические активности против субпопуляции Aldefluor™-положительных клеток из полученных от пациентов с CRC трех различных типов клеток, зафиксированных из свежих биоптатов метастазов печени (Фигура 1).

### **Соединение 2-3 блокирует образование опухолевых сфер из клеток, полученных от пациентов с метастазирующим в печень CRC.**

Образование опухолевой сферы *in vitro* широко используется для идентификации присутствия раковых стволовых клеток (CSC) в солидных опухолях или гетерогенных популяциях клеток, поскольку только эти клетки обладают способностью к самоовосстановлению. Мы использовали этот анализ в качестве функциональной меры частоты и жизнеспособности CSC, а также изучили способность клеток, полученных от пациентов с метастазами в печени, образовывать опухолевые сферы после обработки соединением **2-3**. С

этой целью клетки сначала выращивали в тканевой культуральной колбе с полной средой DMEM с фетальной бычьей сывороткой (FBS) в виде монослоя, пока они не достигали приближения к конфлюентности. Клетки трипсинизировали, собирали, промывали для удаления FBS и пропускали через сито с ячейками 40 мкм. Суспензию отдельных клеток затем культивировали в среде для CSC (т.е. в среде M11), состоящей из DMEM-F12, дополненной 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF и добавлением N2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США), в P96-луночных планшетах с ультра-низким связыванием (Corning Life Sciences, Тьюксбери, Массачусетс). Клетки высевали при плотности 500 клеток/100 мкл на лунку и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Для определения влияния соединения **2-3** на эффективность образования опухолевых сфер и размер сферы, соединение **2-3** добавляли в двух концентрациях (0,3 мкМ или 3 мкМ) через 24 часа после посева в конечном объеме 200 мкл M11. Через 10 дней планшеты исследовали на образование опухолевой сферы (>50 мкм) с использованием инвертированного микроскопа. Делали снимки фазового контраста, размер и количество сфер измеряли вручную и подсчитывали на основании изображений, используя ImageJ. Как показано на фигуре 2, соединение **2-3** индуцирует сильное и дозозависимое уменьшение образования опухолевых сфер в трех тестируемых клетках, полученных от пациентов с CRC, выделенных из печеночных метастазов (CPR19, CPR30 и CPR36). Действительно, эффективность образования опухолевых сфер значительно подавлялась 3 мкМ соединением **2-3**. Напротив, размер опухоли не был статистически уменьшен обработкой, за исключением 3 мкМ на клетках CPR19 ( $p=0,02$ ).

**Пример 10: Исследование ингибирования роста (EC<sub>50</sub>, мкМ) клеток, полученных от пациентов гепатоцеллюлярной карциномой (HCC), в присутствии соединения 2-3**

Клетки, полученные от пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (HCC), брали после получения письменного информированного согласия в соответствии с одобрением Институционального наблюдательного совета CrownBio и под строгим

соблюдением Хельсинкской декларации о медицинских исследованиях с участием людей.

Клетки, полученные от пациента с гепатоцеллюлярной карциномой (HCC), поддерживали в среде, соответственно описанной в таблице 15, содержащей 1% пенициллина-стрептомицина (Life Technologies, 15070-063), с добавками для первичной клеточной культуры (PCS), содержащей гидрокортизон (50 нМ), эпидермальный фактор роста (20 нг/мл), фактор роста  $\beta$ -фибробластов (10 нг/мл), гепарин (2 мкг/мл), жидкую добавку ITS к среде (1 $\times$ ) и заменимую аминокислоту (NEAA, 0,01 мМ, 1 $\times$ ). Первичные клетки культивировали в увлажненной атмосфере (относительная влажность 95%) с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

**Таблица 15: Культуральная среда и условия культивирования для клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), полученных от пациентов**

| Пун<br>кт | Первичная<br>клетка | Культуральная среда     | Условия культивирования                                      |
|-----------|---------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1         | LI0050              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |
| 2         | LI0574              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |
| 3         | LI0612              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |
| 4         | LI0752              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |
| 5         | LI0801              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |
| 6         | LI1005              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |
| 7         | LI1098              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |
| 8         | LI1646              | DMEM/F12+10%<br>FBS+PCS | 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ,<br>относительная влажность<br>95% |

Анализ ингибирования роста клеток проводили, как описано ранее в примере 5, с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, как описано

изготовителем (Promega, Ref G7571). Количество клеток, посеянных на лунку (в TC-обработанных 96-луночных микропланшетах с плоским прозрачным дном из черного полистирола, № по каталогу 3340, Corning®), описано в таблице 16. На дно каждой пластины перед записью люминесценции CellTiter-Glo® помещали черную наклейку, обеспечивающую непрозрачность (№ по каталогу 6005189, Perkin Elmer).

**Таблица 16: Количество клеток, посеянных на лунку для анализа жизнеспособности клеток, полученных от пациентов с НСС**

| Пункт | Клетки,<br>полученные от<br>пациентов с<br>НСС | Количество клеток<br>на лунку |
|-------|------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1     | LI0050                                         | 2500                          |
| 2     | LI0574                                         | 3000                          |
| 3     | LI0612                                         | 4000                          |
| 4     | LI0752                                         | 3500                          |
| 5     | LI0801                                         | 2500                          |
| 6     | LI1005                                         | 2500                          |
| 7     | LI1098                                         | 2000                          |
| 8     | LI1646                                         | 2000                          |

Экспериментальные данные анализировали с использованием компьютерной программы Graphpad Prism V 5.0 (GraphPad Software, Inc. Ла-Хойя, Калифорния), и значения  $EC_{50}$  определяли как дозу соединения, необходимую для снижения значений оптической плотности до 50% сигнала, полученного для клеточных культур, обработанных растворителем, и представляли собой среднее значение, по меньшей мере, из трех независимых экспериментов.

После 72 часов инкубации соединение 2-3 демонстрировало дозозависимые цитотоксические активности против восьми различных типов клеток, полученных от пациентов с НСС (см. таблицу 17).

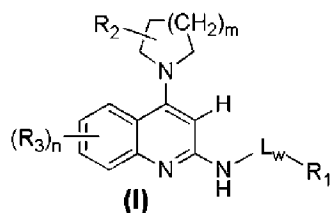
**Таблица 17: Анализ ингибирования роста клеток, полученных от пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (НСС), в присутствии соединения 2-3, сорафениба и цисплатина**

| Пункт | Клетки,<br>полученные<br>от<br>пациентов с<br>НСС | $EC_{50}$ (мкМ) |           |           |
|-------|---------------------------------------------------|-----------------|-----------|-----------|
|       |                                                   | 2-3             | Сорафениб | 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 ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Соединение формулы (I)



в которой

**R<sub>1</sub>** выбран из C6-C10 арила, замещенного или не замещенного R<sub>9</sub>; гетероарильного 5-8-членное кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, замещенного или не замещенного R<sub>9</sub>; конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода, замещенного или не замещенного R<sub>9</sub>;

**L<sub>w</sub>** выбран из необязательно замещенного (C1-C10) алкила; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного R<sub>4</sub>; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; C=O; SO; SO<sub>2</sub>; (C=O)-NR<sub>8</sub>; (C=O)-O; (C=O)-O-(C1-C4) алкила; SO<sub>2</sub>-NR<sub>8</sub>; NR<sub>8</sub>; где **R<sub>4</sub>** выбран из H; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; необязательно замещенного (C6-C10) арила; гетероарильного 5-8-членного кольца или конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода, замещенного или не замещенного одной или несколькими группами заместителей, независимо выбранных из водорода, атома галогена, (C1-C10) алкила, замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C1-C10) алкокси, гидроксила, циано, нитро, карбокси, NR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>, 4-9-членного насыщенного или ненасыщенного кольца,

содержащего 1, 2 или до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S;

$R_2$  выбран из  $NR_5R_6$ ;

$R_3$  выбран из атома водорода; атома галогена; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, гидроксилем, алкокси,  $-NR_5R_6$ ; (C2-C10) алкенила; (C2-C10) алкинила; (C3-C10) циклоалкила; (C5-C10) циклоалкенила; (C8-C10) циклоалкинила; (C1-C10) алкокси; гидроксила; нитро; циано;  $NR_5R_6$ ;  $O-(R_7)$ ;  $(CO)-R_7$ ;  $(CO)-O-R_7$ ;  $(CO)-NR_5R_6$ ;  $O-(CO)-R_7$ ;  $O-(CO)-NR_5R_6$ ;  $NR_5-(CO)-R_7$ ;  $NR_5-(CO)-OR_7$ ;  $NR_5-(CO)-NR_5R_6$ ;  $-(O-CH_2CH_2-)_m-OR_{11}$ ;  $-(O-CH_2CH_2-)_m-NR_{11}R_{11}$ ;  $SO_2-R_7$ ;  $NR_5-SO_2-R_7$ ;  $SO_2-NR_5R_6$ ;  $NR_5-(C2-C6)$ -алкил- $NR_5R_6$ ; необязательно замещенного арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенного конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода; необязательно замещенного гетероциклического 4-9-членного кольца, насыщенного или ненасыщенного, содержащего 1, 2 или до 3 гетероатома, независимо выбранных из O, N и S;

$R_5$  и  $R_6$  независимо выбраны из водорода; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила;  $(CO)-R_7$ ,  $(CO)-O-R_7$ ;  $(CO)-NR_8R_8$ ;  $SO_2-R_7$ ;  $SO_2-NR_8R_8$ ; (C1-C10) алкила, замещенного  $NR_8R_8$ ; (C3-C10) циклоалкила, замещенного  $NR_8R_8$ ; необязательно замещенного арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенного гетероциклического 4-9-членного кольца, насыщенного или ненасыщенного, содержащего 1, 2 или до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S; или  $R_5$  и  $R_6$  связаны вместе с

атомом азота, к которому они ковалентно присоединены, с образованием гетероциклической группы, образующей 4-9-членное кольцо, которое может содержать дополнительные 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

$R_7$  и  $R_7'$  независимо выбраны из водорода; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; C1-C10 линейного или разветвленного алкила, замещенного  $NR_8R_8'$ ; необязательно замещенного (C6-C10) арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероароматического 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

$R_8$  и  $R_8'$  независимо выбраны из водорода; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; или  $R_8$  и  $R_8'$  связаны вместе с атомом азота, к которому они ковалентно присоединены, с образованием гетероциклической группы, образующей 4-9-членное кольцо, которое может содержать дополнительные 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

$R_9$  независимо выбран из водорода; атома галогена; необязательно замещенного (C1-C10) алкила; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, гидроксильной группой, алкокси; необязательно замещенного (C2-C10) алкенила; необязательно замещенного (C2-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; необязательно замещенного (C1-C10) алкокси; гидроксильной группой; нитро; циано;  $NR_5R_6$ ; (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)-O- $R_7$ ;  $NR_5$ -(CO)- $NR_5R_6$ ; SO<sub>2</sub>- $R_7$ ;  $NR_5$ -SO<sub>2</sub>- $R_7$ ; SO<sub>2</sub>- $NR_5R_6$ ; (C1-C10) алкила, замещенного  $NR_5R_6$ ;  $NR_5$ -(C2-C10)-алкил- $NR_5R_6$ ; -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OR<sub>11</sub>; -

$(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_m-\text{NR}_{11}\text{R}_{11}'$ ; необязательно замещенного (C6-C10) арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенной гетероциклической группы, образующей 4-9-членное кольцо, которое может содержать 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; -  $\text{NR}_5\text{R}_{10}$ ;  $-\text{O}-\text{R}_{10}$ ;

$\text{R}_{10}$  независимо выбран из водорода; (C6-C12)-арила, замещенного или не замещенного  $\text{R}_{12}$ ; бензила, замещенного или не замещенного  $\text{R}_{12}$ ; гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, замещенного или не замещенного  $\text{R}_{12}$ ; конденсированного гетероарила, определенного как содержащий от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащий, по меньшей мере, 2 атома углерода, замещенного или не замещенного  $\text{R}_{12}$ ; гетероциклила, образующего 4-9-членное кольцо, которое может содержать 0, 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, замещенного или не замещенного  $\text{R}_{12}$ ;

$\text{R}_{11}$  и  $\text{R}_{11}'$  независимо выбраны из атома водорода; необязательно замещенного (C2-C10) алкила; необязательно замещенного (C3-C10) алкенила; необязательно замещенного (C3-C10) алкинила; необязательно замещенного (C3-C10) циклоалкила; необязательно замещенного (C5-C10) циклоалкенила; необязательно замещенного (C8-C10) циклоалкинила; (C2-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена; или  $\text{R}_{11}$  и  $\text{R}_{11}'$  связаны вместе с атомом азота, к которому они ковалентно присоединены, с образованием гетероциклической группы, образующей насыщенное или ненасыщенное 4-9-членное кольцо, которое может содержать дополнительные 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S;

$\text{R}_{12}$  выбран из атома водорода; атома галогена; (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, гидроксилем, алкокси,  $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}'$ ; (C2-C10) алкенила; (C2-C10) алкинила; (C3-C10) циклоалкила; (C5-C10) циклоалкенила; (C8-C10) циклоалкинила; (C1-C10) алкокси; гидроксила; нитро; циано;

NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>·; O-(R<sub>7</sub>); (CO)-R<sub>7</sub>; (CO)-O-R<sub>7</sub>; (CO)-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>·; O-(CO)-R<sub>7</sub>; O-(CO)-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>·; NR<sub>11</sub>-(CO)-R<sub>7</sub>; NR<sub>11</sub>-(CO)-OR<sub>11</sub>·; NR<sub>11</sub>-(CO)-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>·; -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)<sub>m</sub>-OR<sub>11</sub>; -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)<sub>m</sub>-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>·; SO<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>; NR<sub>5</sub>-SO<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>; SO<sub>2</sub>-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>·; NR<sub>11</sub>-(C2-C6)-алкил-NR<sub>11</sub>R<sub>11</sub>·; необязательно замещенного арила; необязательно замещенного бензила; необязательно замещенного гетероарильного 5-8-членного кольца, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S; необязательно замещенного конденсированного гетероарила согласно определению, содержащего от 8 до 13 атомов, включая 1, 2, 3, 4 гетероатома, выбранных из O, N и S, и содержащего, по меньшей мере, 2 атома углерода; необязательно замещенного гетероциклического 4-9-членного кольца, насыщенного или ненасыщенного, содержащего 1, 2 или до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S;

n может представлять собой равное целое число, которое может иметь любое из значений 0, 1, 2, 3 или 4;

m может представлять собой равное целое число, которое может иметь любое из значений 1, 2 или 3;

w может представлять собой равное целое число, которое может иметь любое из значений 0 или 1;

Где термин "необязательно замещенный" означает необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из атома галогена, (C1-C10) алкила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C2-C10) алкенила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C2-C10) алкинила, линейного или разветвленного, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C3-C10) циклоалкила, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C5-C10) циклоалкенила, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C8-C10) циклоалкинила, замещенного или не замещенного одним или несколькими атомом(атомами) галогена, (C1-C10) алкокси, гидроксила, циано, нитро, NR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>· (с R<sub>8</sub> и R<sub>8</sub>·, как описано выше);

и любые его фармацевтически приемлемая соль, сольват,

изомеры, стереоизомеры или смеси стереоизомеров, сольват или пролекарство.

2. Соединение по п.1, выбранное из 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (1-5); 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (2-2); 2-[3-метил-4-(пиримидин-2-иламино)фениламино]-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (3-4); 22-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (4-2), или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или пролекарство.

3. Соединение по п.1, выбранное из гидрохлоридной соли 2-(4-хлорфениламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (1-6), гидрохлоридной соли 2-(4-хлорбензиламино)-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (2-3), гидрохлоридной соли 2-[3-метил-4-(пиримидин-2-иламино)фениламино]-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (3-5), гидрохлоридной соли 2-{4-[4-(пиридин-3-ил)-2-пиримидинамино]-3-метил-фениламино}-4-(4-*трет*-бутиламинопиперидин-1-ил)-хинолина (4-3), или его фармацевтически приемлемый сольват или пролекарство.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по любому из п.п.1-3 или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или пролекарства и фармацевтически приемлемый адъювант, разбавитель или носитель.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, дополнительно содержащая одно или несколько противоопухолевых средств.

6. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.4 и 5, в которой терапевтически эффективное количество соединения по любому из п.п.1-5 находится в составе или находится в комбинации в составе наночастиц.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, в которой наночастицы содержат полимерную биоразлагаемую композицию.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, в которой полимер основан на поли(DL-молочная-со-гликолевая кислота), имеющем молекулярную массу от 7 до 240 кДа; или сополимере полимолочной кислоты (PLA) и полигликолевой кислоты (PGA), где молекулярное соотношение может находиться в интервале от 95:5 до 50:50.

9. Фармацевтическая композиция по п.6, в которой наночастицы содержат лизосомальную биоразлагаемую композицию.

10. Фармацевтическая композиция по п.6, в которой наночастицы содержат биосовместимый полимер или сополимер.

11. Фармацевтическая композиция по п.6, в которой наночастицы содержат липосомальный состав.

12. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.6-11, в которой наночастицы связаны ковалентно или нековалентно с полиэтиленгликолем (PEG).

13. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.6-12, в которой наночастицы имеют средний размер от приблизительно 80 до приблизительно 600 нм.

14. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.6-13, в которой соединение по любому из п.п.1-3 действует совместно, по меньшей мере, с одним терапевтически активным противораковым средством.

15. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.6-14, которая подходит для перорального, парентерального, офтальмологического, трансдермального, назального введения или для ингаляции.

16. Фармацевтическая композиция по п.6, в которой наночастицы содержат элемент, выбранный из наночастиц PLGA, наночастиц PLGA-PEG (блок типа АВ, ВА, АВА или ВАВ, где А=PLGA и В=PEG) и специфических наночастиц.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, в которой наночастица представляет собой специфическую наночастицу, содержащую сигнальный мотив.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию терапевтически эффективного количества соединения по любому из п.п.1-3 и терапевтически эффективного количества одного или нескольких противоопухолевых средств, где компоненты, составляющие указанную комбинацию, предназначены для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии рака.

19. Фармацевтическая композиция по п.5 или п.18, где противоопухолевое средство выбрано из группы, состоящей из

эверолимуса, хлорохина, гидроксихлорохина, трабектедина, абраксана, TLK 286, AV-299, DN-101, пазопаниба, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, энзастаурина, вандетаниба, ARQ-197, МК-0457, MLN8054, PNA-739358, R-763, AT-9263, пеметрекседа, эрлотиниба, дазатаниба, нилотиниба, декатаниба, панитумумаба, амрубицина, ореговомаба, Lep-etu, нолатрекседа, azd2171, батабулина, офатумумаба, занолимумаба, эдотекарина, тетрандрина, рубитекана, тесмилифена, облимерсена, тицилимумаба, ипилимумаба, госсипола, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, цилингитида, гиматекана, IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, люкантона, LY 317615, нейрадиба, витеспана, Rta 744, Sdx 102, талампанеля, атрасентана, Xr 311, ромидепсина, ADS-100380, сунитиниба, 5-фторурацила, вориностата, этопозид, гемцитабина, доксорубицина, иринотекана, липосомального доксорубицина, 5'-дезоксигемцитабина, винкристина, темозоломида, ZK-304709, селициклиба, PD0325901, AZD-6244, капецитабина, динатриевой соли N-[4-[2-амино-4,7-дигидро-4-оксо-1H-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты гептагидрата, камптотецина, PEG-меченого иринотекана, тамоксифена, цитрата торемифена, анастразола, экземестана, летрозолола, DES (диэтилстильбэстрол), эстрадиола, эстрогена, конъюгированного эстрогена, бевацизумаба, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(метилсульфонилпиперазинметил)-индолил]-хинолона, ваталаниба, AG-013736, AVE-0005, ацетатной соли [D-Ser(But)<sub>6</sub>, Azgly<sub>10</sub>] (пиро-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub> ацетат, гозерелина ацетат), лейпролида ацетата, трипторелина памоата, медроксипрогестерона ацетата, гидроксипрогестерона капроата, мегестрола ацетата, ралоксифена, бикалутамида, флутамида, нилутамида, мегестрола ацетата, CP-724714; TAK-165, HKI-272, эрлотиниба, лапатаниба, канертиниба, ABX-EGF-антитела, эрбитукса, ЕКВ-569, PKI-166, GW-572016, лонафарниба, BMS-214662, типифарниба; амифостина, NVP-LAQ824, субероилланилидгидроксамовой кислоты, вальпроевой кислоты, трихостатина А, FK-228, SU11248, сорафениба, KRN951, аминоклутетимида, амсакрина, анагрелида, L-аспарагиназы, вакцины на основе бациллы Кальметта-Герена (BCG),

блеомицина, бусерелина, бусульфана, карбоплатина, кармустина, хлорамбуцила, цисплатина, кладрибина, клодроната, ципротерона, цитарабина, дакарбазина, дактиномицина, даунорубицина, диэтилстилбестрола, эпирубицина, флударабина, флудрокортизона, флуоксиместерона, флутамида, гемцитабина, гливек, гидроксимочевины, идарубицина, ифосфамида, иматиниба, лейпролида, левамизола, ломустина, мехлорэтамину, мелфалана, 6-меркаптопурина, месны, метотрексат, митомицина, митотан, митоксантрон, нилутамида, октреотид, оксалиплатина, памидронат, пентостатин, пликамицин, порфимер, прокарбазин, ралтитрексед, ритуксимаб, стрептозоцин, тенипозид, тестостерон, талидомида, тиогуанин, тиотеп, третиноин, виндезин, 13-цис-ретиноевой кислоты, фенилаланин мустард, урацил мустард, эстрамустина, алтретамин, флоксуридин, 5-дезоксинуридин, цитозинарабинозид, 6-меркаптопурина, дезоксиформин, кальцитриол, валрубицин, митрамицин, винбластин, винорелбин, топотекан, разоксин, маримастат, COL-3, неовастат, BMS-275291, скваламин, эндостатин, SU5416, SU6668, EMD121974, интерлейкин-12, 1M862, ангиостатин, витаксин, дролоксифен, идоксифен, спиронолактон, финастерид, цимитидин, трастузумаб, денилейкин дифтитокс, гифитиниб, бортезомиб, паклитаксел, иринотекан, топотекан, доксорубин, доцетаксел, винорелбин, бевацизумаб (моноклональное антитело) и эрбитукс, не содержащего кремофора паклитаксел, эпителин В, BMS-247550, BMS-310705, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, пипендоксифен, ERA-923, арзоксифен, фулвестрант, аколбифен, лазофоксифен, идоксифен, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK222584, VX-745, PD 184352, рапамицин, 40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, темсиrolimus, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, вортманнин, ZM336372, L-779450, PEG-филграстим, дарбепоедин, эритропоедин, колониестимулирующего фактора гранулоцитов, золендронат, преднизон, цетуксимаб, колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов, гистрелин, пегилированного интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2а, пегилированного интерферона альфа-2b, интерферона

альфа-2b, азацитидина, PEG-L-аспарагиназы, леналидомида, гемтузумаба, гидрокортизона, интерлейкина-11, декстразоксана, алемтузумаба, полностью транс-ретиноевой кислоты, кетоконазола, интерлейкина-2, мегестрола, азотистого иприта, метилпреднизолона, ибритгумомаб тиуксетана, андрогенов, децитабина, гексаметилмеламина, бексаротена, тозитумомаба, трехокси мышьяка, кортизона, эдитроната, митотана, циклоспорина, липосомного даунорубицина, аспарагиназы Эдвина, стронция 89, касопитанта, нетупитанта, антагонистов рецептора NK-1, палоносетрона, апрепитанта, дифенгидрамина, гидроксизина, метоклопрамида, лоразепама, алпразолама, галоперидола, дроперидола, дронабинола, дексаметазона, метилпреднизолона, прохлорперазина, гранисетрона, ондансетрона, доласетрона, трописетрона, пегфилграстима, эпоэтина альфа и дарбепоетина альфа, ипилумумаба, вемурафениба, ингибитора FLT-3, ингибитора VEGFR, ингибитора TK EGFR, ингибитора авророкиназы, модулятора PIK-1, ингибитора Bcl-2, ингибитора HDAC, ингибитора c-MET, ингибитора PARP, ингибитора Cdk, ингибитора TK EGFR, ингибитора IGFR-TK, антитела против HGF, ингибиторов киназы PI3, ингибитора mTOR, ингибитора AKT, ингибитора JAK/STAT, ингибитора контрольной точки 1 или 2, ингибитора киназы фокальной адгезии, ингибитора киназы Map-киназы (MEK), антитела-ловушки VEGF и их смесей.

20. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.4-19, подходящая для замедленного или пролонгированного высвобождения.

21. Применение соединения по любому из п.п.1-3 в терапии.

22. Применение соединения по любому из п.п.1-3 в качестве терапевтически активного вещества для лечения и/или профилактики пролиферативного и/или неопластического заболевания.

23. Применение по п.22, где пролиферативное и/или неопластическое заболевание выбрано из группы, состоящей из: карциномы; головы, почки, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, груди, шейки матки, поджелудочной железы, предстательной железы или желудка; лейкемии (например, острой миелогенной лейкемии, острой лимфоцитарной лейкемии, острой промиелоцитарной лейкемии (ОПЛ), острой Т-клеточной

лимфобластной лейкемии, Т-клеточной лейкемии взрослых, базофильной лейкемии, эозинофильной лейкемии, гранулоцитарной лейкемии, лейкемии волосатых клеток, лейкопенической лейкемии, лимфатической лейкемии, лимфобластной лейкемии, лимфоцитарной лейкемии, мегакариоцитарной лейкемии, микромиелобластной лейкемии, моноцитарной лейкемии, нейтрофильной лейкемии и лейкемии стволовых клеток); злокачественной лимфомы, злокачественной меланомы; миелопролиферативных заболеваний; саркомы; опухоли центральной нервной системы; опухоли зародышевой линии; рака яичек; рака щитовидной железы; астроцитомы; рака пищевода; рака толстой кишки и неоплазии смешанного типа.

24. Способ лечения и/или профилактики пролиферативного и/или неопластического заболевания, который включает стадию введения терапевтически активного количества соединения по любому из пп.1-3 или фармацевтической композиции по любому из пп. 4-20 человеку или животному, нуждающемуся в этом.

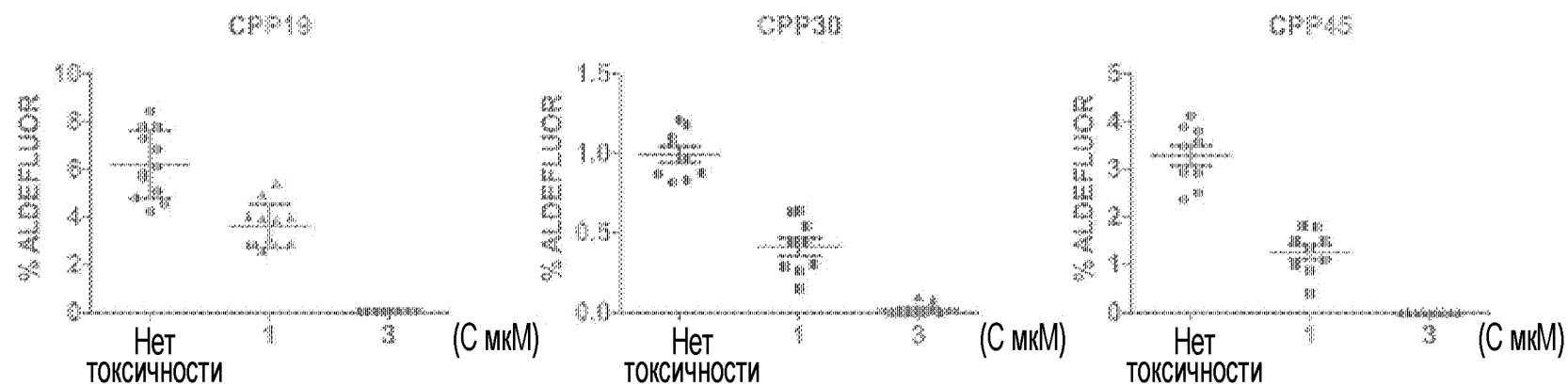
25. Способ ингибирования роста или дифференцировки раковой стволовой клетки (CSC), опухоль-инициирующей клетки, мезенхимально-подобной клетки, связанной с раком, мезенхимальной раковой клетки или мезенхимальной клетки, который включает стадию введения терапевтически активного количества соединения по любому из п.п.1-3 или фармацевтической композиции по любому из п.п.4-20 человеку или животному, нуждающемуся в этом.

26. Соединение по любому из п.п.1-3 или фармацевтическая композиция по любому из п.п.4-20 для лечения и/или профилактики пролиферативного и/или неопластического заболевания.

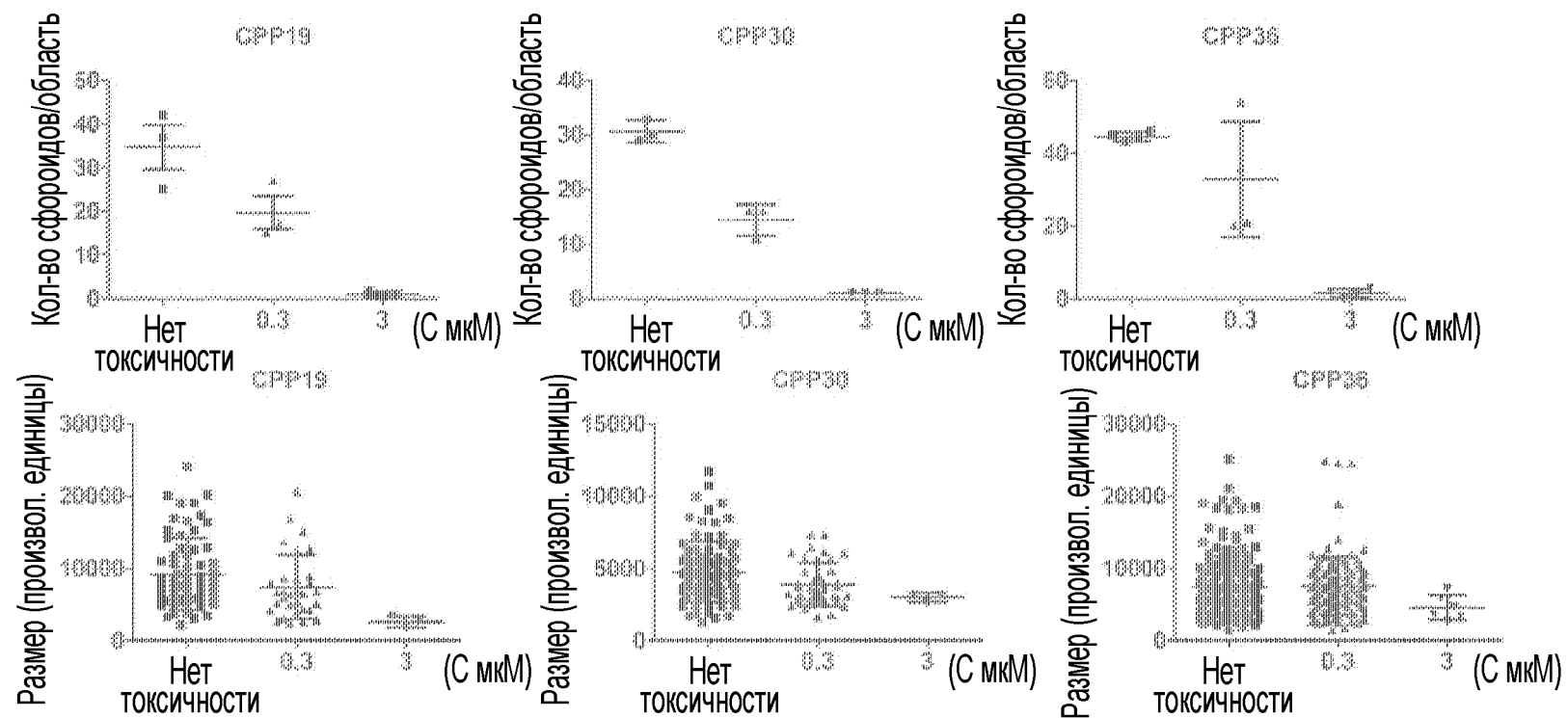
27. Соединение по любому из пп.1-3 или фармацевтическая композиция по любому из п.п.4-20 для ингибирования роста или дифференцировки раковой стволовой клетки (CSC), опухоль-инициирующей клетки, мезенхимально-подобной клетки, связанной с раком, мезенхимальной раковой клетки или мезенхимальной клетки.

По доверенности

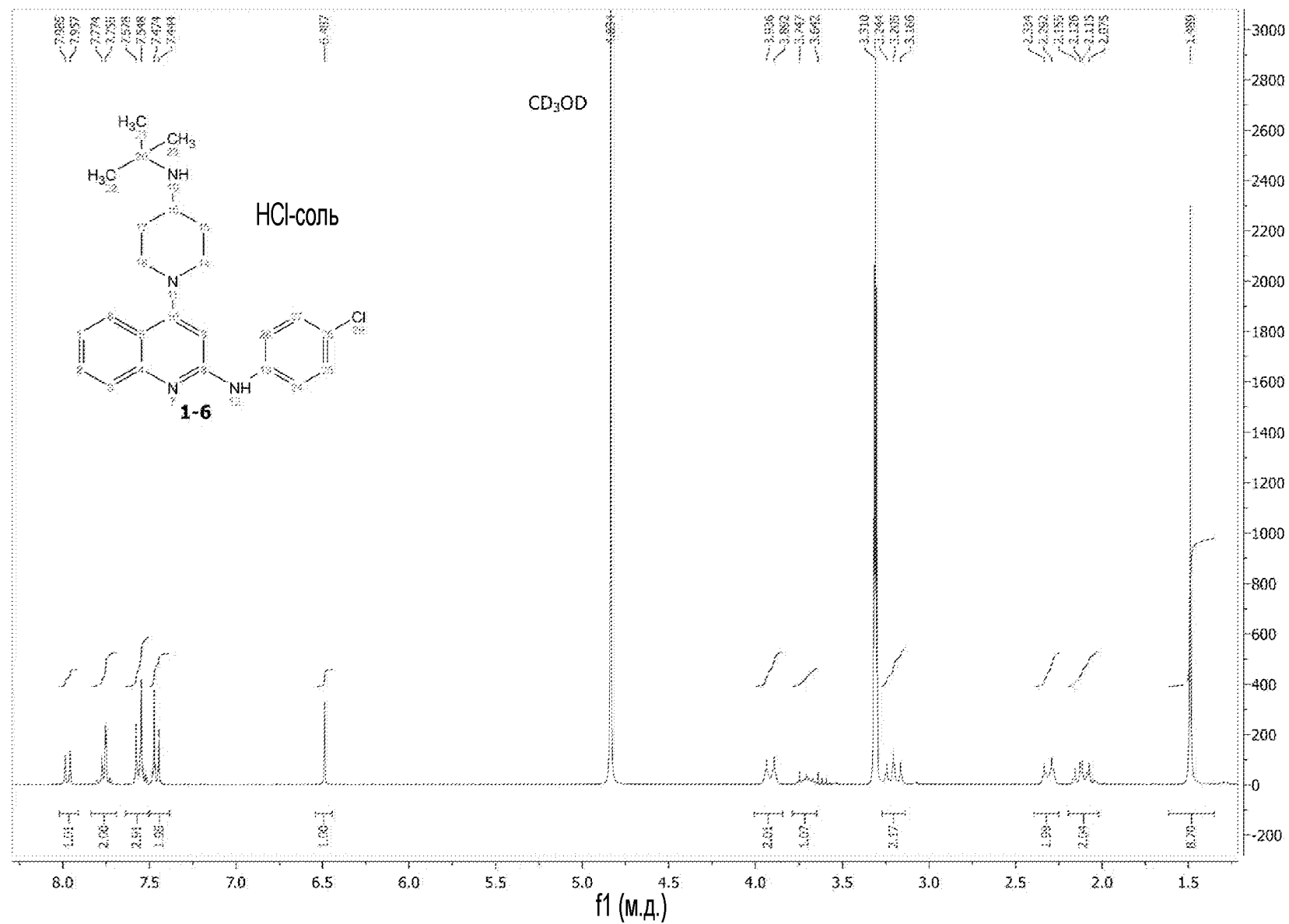
ФИГ.1



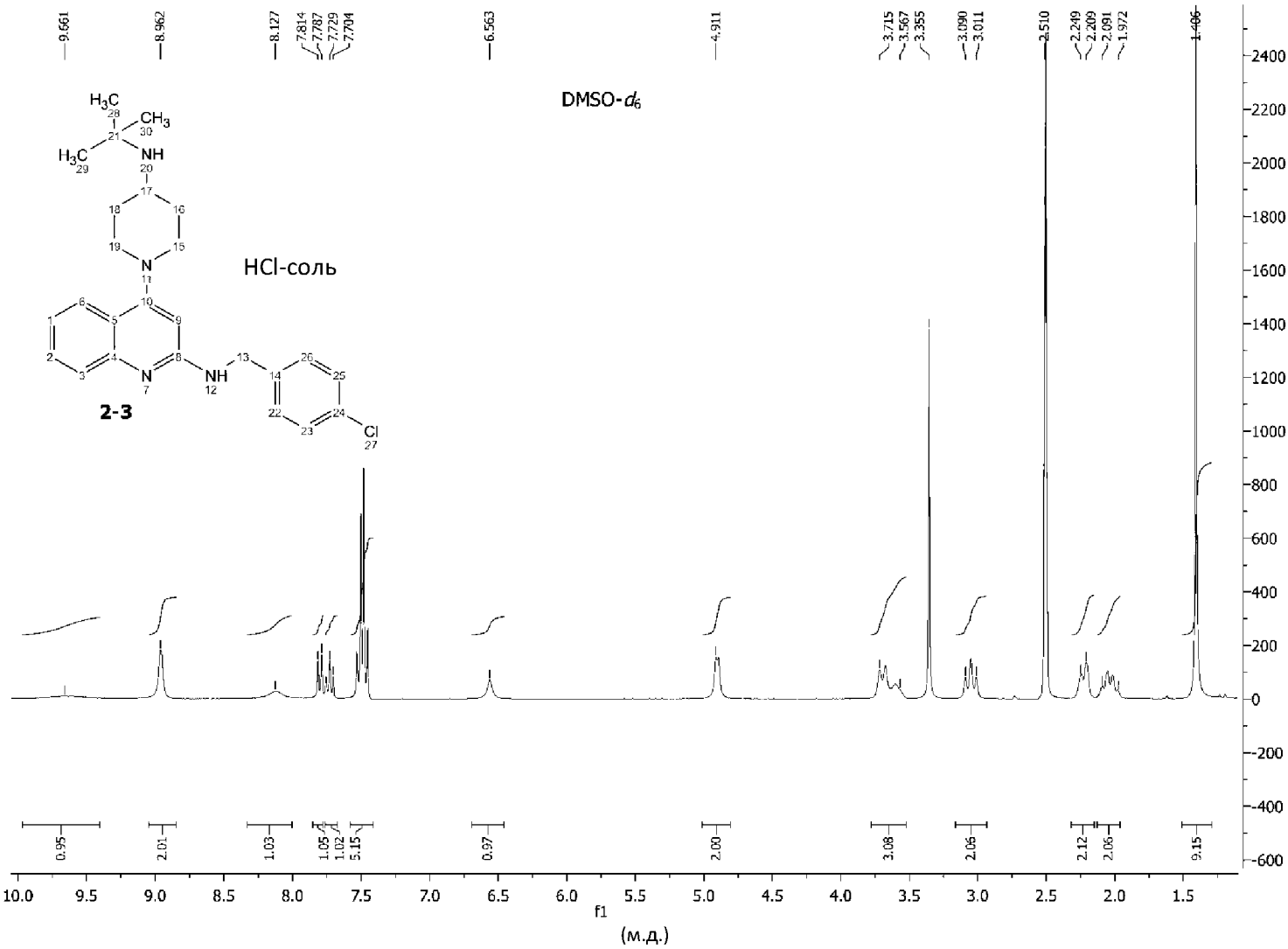
ФИГ. 2



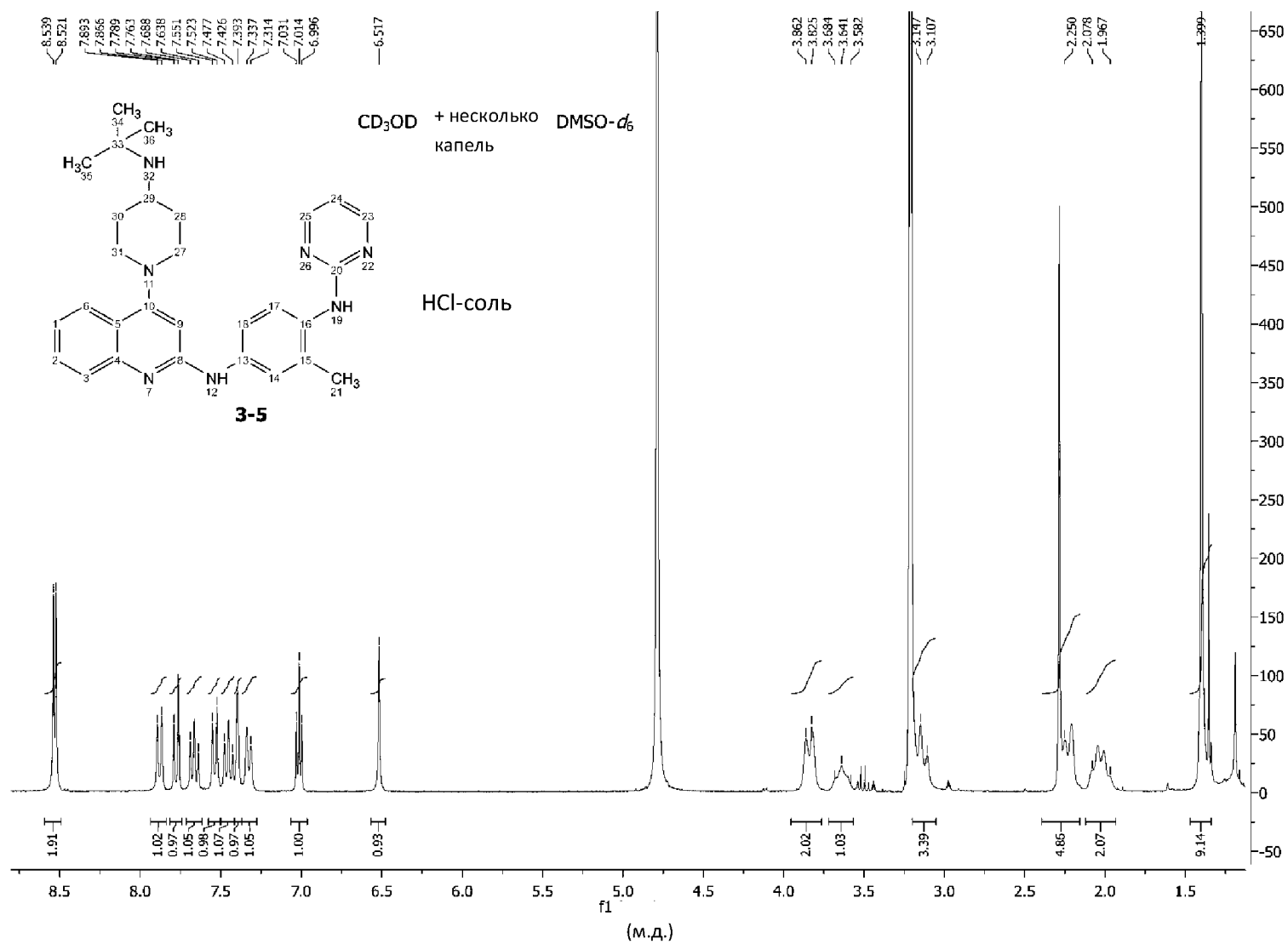
ФИГ. 3



ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6

