(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 036177 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.09

(21) Номер заявки
201690376

(22) Дата подачи заявки
2014.08.13

(51) Int. Cl. ***C07D 417/12*** (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ ДЕЗОКСИЦИТИДИНКИНАЗЫ

(31) **61/865,468**
(32) **2013.08.13**
(33) **US**
(43) **2016.07.29**
(86) **PCT/US2014/050931**
(87) **WO 2015/023776 2015.02.19**

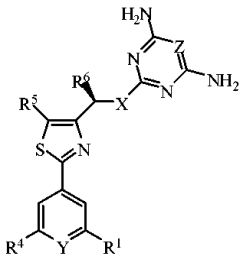
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ; ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЛЛИНОЙС (US)

(72) Изобретатель:
Раду Каюс Г., Ли Чжэн, Гипсон Рэймонд М., Ван Дзуе, Сатиамурти Нагихеттиар, Лави Арнон, Мерфи Дженнифер М., Натансон Девид А., Джунг Майкл Е. (US)

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

(56) WO-A1-2012122368
US-A1-20080146571

(57) В изобретении представлены соединения формулы (IA), где все заместители раскрыты в формуле изобретения, которые связывают dCK, и способы лечения рака. Более конкретно, производные 2-фенилтиазола, связанные с 4,6-диаминопиримидиновым фрагментом, раскрыты как ингибиторы активности дезоксицитидинкиназы. Кроме того, представлены ингибиторы - соединения, имеющие стереоцентр. Данные соединения имеют терапевтическое применение в лечении рака



(IA)

036177 B1

036177 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки США № 61/865468, поданной 13 августа 2013, которая включена в данный документ в виде ссылки в полном объеме во всех смыслах.

Заявление касательно прав на изобретения, сделанные в соответствии с исследованием и разработкой, финансированными из Федерального бюджета

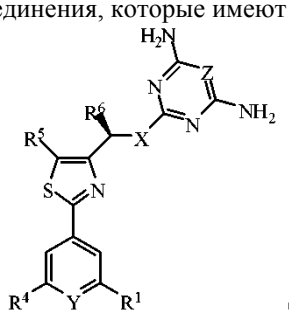
Изобретение было сделано при поддержке правительства по номерам грантов CA086306 и R01 EB013685, которые были предоставлены Национальному институту здоровья. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Предпосылки создания изобретения

Дезоксицитидинкиназа (dCK) представляет собой дезоксирибонуклеозидкиназу, способную фосфорилировать дезоксицитидин, дезоксиаденозин и дезоксигуанозин до их монофосфатных форм, используя или АТФ, или УТФ как доноры фосфорила.[1] Фосфорилирование dCK является лимитирующей скорость стадией в биохимическом пути, отвечающем за превращение восстановленного дезоксицитидина в дЦТФ и в определенных типах клеток в dTTP, делая их субстратами для ДНК полимераз. Кроме физиологической роли генерирования dNTP, dCK играет критическую роль в активации нескольких нуклеозидных аналогов пролекарств ("nucs"), что широко используется в противораковой терапии.[2] Соответственно, идентифицирование терапевтической направленности dCK имеет большое значение. Представленное в данном документе является решениями этих и других проблем в данной области.

Краткое изложение сущности изобретения

В изобретении представлены соединения, которые имеют формулу



(IA),

где Y представляет собой $C(R^8)$;

Z представляет собой $C(R^9)$ или N;

X представляет собой CH_2, O, $N(R^{10})$, S или S(O);

R^1 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{1A}$, $-OR^{1A}$, $-NR^{1A}R^{1B}$, $-C(O)OR^{1A}$, $-C(O)NR^{1A}R^{1B}$, $-NO_2$, $-SR^{1A}$, $-S(O)_{n1}R^{1A}$, $-S(O)_{n1}OR^{1A}$, $-S(O)_{n1}NR^{1A}R^{1B}$, $-NHNR^{1A}R^{1B}$, $-ONR^{1A}R^{1B}$, $-NHC(O)NHNR^{1A}R^{1B}$, замещенный R^{1A} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{1A} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный фенил, или замещенный R^{1A} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{1A} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, $-OR^{12}$, $-N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-COOR^{12}$, $-CON(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NO_2$, $-S(R^{12})$, $-S(O)_2R^{12}$, $-S(O)_3R^{12}$, $-S(O)_4R^{12}$, $-S(O)_2N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHN(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-ON(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHC(O)NHN(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHC(O)N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHS(O)_2R^{12}$, $-NHC(O)R^{12}$, $-NHC(O)-OR^{12}$, $-NHOR^{12}$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{11} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{11} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{11} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{11} или незамещенный фенил или замещенный R^{11} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{11} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)-OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{12} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{12} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{12} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{12} или незамещенный фенил или замещенный R^{12} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{12}, $R^{12,1}$ и $R^{12,2}$ независимо представляют собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)-OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенный C_1-C_6-алкил, незамещенный 2-6-членный гетероалкил, незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, незамещенный фенил или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^4 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{4A}$, $-OR^{4A}$, $-NR^{4A}R^{4B}$, $-C(O)OR^{4A}$, $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$, $-NO_2$, $-SR^{4A}$, $-S(O)_{n4}R^{4A}$, $-S(O)_{n4}OR^{4A}$, $-S(O)_{n4}NR^{4A}R^{4B}$, $-NHNR^{4A}R^{4B}$, $-ONR^{4A}R^{4B}$, $-NHC(O)NHNR^{4A}R^{4B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный

или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^5 независимо представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{5A}$, $-OR^{5A}$, $-NR^{5A}R^{5B}$, $-C(O)OR^{5A}$, $-C(O)NR^{5A}R^{5B}$, $-NO_2$, $-SR^{5A}$, $-S(O)_{n5}R^{5A}$, $-S(O)_{n5}OR^{5A}$, $-S(O)_{n5}NR^{5A}R^{5B}$, $-NHNR^{5A}R^{5B}$, $-ONR^{5A}R^{5B}$, $-NHC(O)NHNR^{5A}R^{5B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил, где R^5 и R^6 необязательно объединяются с образованием замещенного или незамещенного C_3-C_6-циклоалкила; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^6 представляет собой незамещенный C_1-C_6-алкил;

R^8 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{8A}$, $-OR^{8A}$, $-NR^{8A}R^{8B}$, $-C(O)OR^{8A}$, $-C(O)NR^{8A}R^{8B}$, $-NO_2$, $-SR^{8A}$, $-S(O)_{n8}R^{8A}$, $-S(O)_{n8}OR^{8A}$, $-S(O)_{n8}NR^{8A}R^{8B}$, $-NHNR^{8A}R^{8B}$, $-ONR^{8A}R^{8B}$, $-NHC(O)NHNR^{8A}R^{8B}$, замещенный R^{8A} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{8A} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный фенил или замещенный R^{8A} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{8A} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, $-OR^{15}$, $-N(R^{151})(R^{152})$, $-COOR^{15}$, $-CON(R^{151})(R^{152})$, $-NO_2$, $-SR^{15}$, $-S(O)_2R^{15}$, $-S(O)_3R^{15}$, $-S(O)_4R^{15}$, $-S(O)_2N(R^{151})(R^{152})$, $-NHN(R^{151})(R^{152})$, $-ON(R^{151})(R^{152})$, $-NHC(O)NHN(R^{151})(R^{152})$, $-NHC(O)N(R^{151})(R^{152})$, $-NHS(O)_2R^{15}$, $-NHC(O)R^{15}$, $-NHC(O)OR^{15}$, $-NHOR^{15}$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{15} или незамещенный алкил, замещенный R^{15} или незамещенный гетероалкил, замещенный R^{15} или незамещенный циклоалкил, замещенный R^{15} или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный R^{15} или незамещенный арил или замещенный R^{15} или незамещенный гетероарил;

R^{15}, $R^{15,1}$ и $R^{15,2}$ независимо представляют собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{16} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{16} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{16} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{16} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{16} или незамещенный фенил или замещенный R^{16} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{16} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенный C_1-C_6-алкил, незамещенный 2-6-членный гетероалкил, незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, незамещенный фенил или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^9 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{9A}$, $-OR^{9A}$, $-NR^{9A}R^{9B}$, $-C(O)OR^{9A}$, $-C(O)NR^{9A}R^{9B}$, $-NO_2$, $-SR^{9A}$, $-S(O)_{n9}R^{9A}$, $-S(O)_{n9}OR^{9A}$, $-S(O)_{n9}NR^{9A}R^{9B}$, $-NHNR^{9B}R^{8B}$, $-ONR^{9A}R^{9B}$, $-NHC(O)NHNR^{9A}R^{9B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^{10} представляет собой H, $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$, $-CH_2C_6H_5$;

R^{1A}, R^{1B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{8A}, R^{8B}, R^{9A}, и R^{9B} независимо представляют собой водород, оксо, галоген, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

n1, n4, n5, n8, и n9 независимо представляют собой 1, 2 или 3; и

где гетероалкил, гетероциклил и гетероарил содержат по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S; и

где заместитель у R^4, R^5, R^9, R^{1A}, R^{1B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{8A}, R^{8B}, R^{9A} и R^{9B} выбирают из:

(A) оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$,

$-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, $-NHC=(O)H$, $-NHC(O)OH$, $-NHOH$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(B) C_1-C_6-алкила, гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(i) оксо, галогена, $-CF_3$, $-CN$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-NO_2$, $-SH$, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, $-NHC=(O)H$, $-NHC(O)OH$, $-NHOH$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(ii) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(a) оксо, галогена, $-CF_3$, $-CN$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-NO_2$, $-SH$, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, $-NHC=(O)H$, $-NHC(O)OH$, $-NHOH$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила, и

(b) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из оксо, галогена, $-CF_3$, $-CN$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-NO_2$, $-SH$, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, $-NHC=(O)H$, $-NHC(O)OH$, $-NHOH$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила.

Кроме того, в настоящем документе представлены фармацевтические композиции, включающие соединение, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Кроме того, в настоящем документе представлен способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, где указанный рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, путем введения эффективного количества соединения, которое описано в данном документе.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - соединения-прототипы ингибиторов dCK. (A) Схематическое изображение соединений-прототипов Ia и Ib. Данные соединения состоят из четырех частей: часть A означает пиримидиновое кольцо; часть B представляет собой линкер, присоединяющий 5-замещенное тиазольное кольцо (часть C), за которым следует фенильное кольцо (часть D). Соединения Ia и Ib отличаются заместителем, присутствующим в мета-положении фенила (R_m). (B) Свойства in vitro (IC_{50}^{app} и K_i^{app}) и в клетке (IC_{50}) для Ia и Ib;

фиг. 2 - модификации пиримидинового кольца. (A) Схематическое изображение соединения 1, которое имеет единственную экзоциклическую аминогруппу, и соединения 2, которое имеет атом азота в кольце между двумя экзоциклическими аминогруппами. (B) Свойства in vitro (IC_{50}^{app} и K_i^{app}) и в клетке (IC_{50}) для 1 и 2. C). Перекрывание структур dCK-2 и dCK-Ia с акцентом на пиримидиновое кольцо. Обратите внимание на сдвинутое на ~0,4 Å положение 2 по отношению к Ia, что происходит вследствие присутствия молекулы воды (кружочек). Связывание данной молекулы воды становится возможным благодаря N-атому кольца в соединении 2;

фиг. 3 - модификации мета-положения фенильного кольца. (A) Схематическое изображение соединений 3 и 4, которые отличаются природой заместителя в мета-положении. (B) Свойства in vitro (IC_{50}^{app} и K_i^{app}) и в клетке (IC_{50}) для 3 и 4. (C) Перекрывание структур dCK-3 и dCK-4 с акцентом на мета-положение фенильного кольца. Прочное связывание 4 по сравнению с 3 может быть логически обоснованным взаимодействием более длинного мета-заместителя с S144/S146 dCK;

фиг. 4 - модификации пара-положения фенильного кольца. (A) Схематическое изображение соединений 5 и 6, которые отличаются природой заместителя в пара-положении. (B) Свойства in vitro (IC_{50}^{app} и K_i^{app}) и в клетке (IC_{50}) для 5 и 6. (C) Перекрывание dCK-5 (сине-зеленый) и dCK-6 (бежевый) структур с акцентом на пара-положение фенильного кольца. Ингибиторы связываются чрезвычайно аналогичным образом; заместители в мета-положении вступают в прямое взаимодействие с ферментом, а пара-заместитель нет. Очень похожие значения IC_{50}^{app} и K_i^{app} 5 и 6 объясняются отсутствием прямых взаимодействий с ферментом через пара-положение. В отличие от этого, присутствие заместителя в пара-положении понижает определенное значение IC_{50} на основе клетки;

фиг. 5 - модификации линкера. (A) Схематическое изображение соединений 7 и 8. Оба соединения были синтезированы как рацемическая смесь (R/S) - добавление метильной группы (стрелка) к метиленовой линкерной группе делает данные соединения хиральными. В свою очередь 7 имеет пропильную группу в 5-положении тиазольного кольца (R_t), 8 имеет метильную группу. (B) Свойства in vitro (IC_{50}^{app} и K_i^{app}) и в клетке (IC_{50}) для 7 и 8. (C) Пропильная группа в тиазольном кольце дает 7 связываться, как единственной молекуле, с положением-1 сайта связывания dCK (см. текст для деталей). Примечательно, несмотря на образование фермент-ингибитор с рацемическим 7, в кристаллической структуре мы наблю-

даем только R-изомер (соединение 7, Fo-Fc пренебрегая отображением, контурированным при 2 сигма). Теоретическая модель S-изомера демонстрирует, что только R-изомер соответствует электронной плотности. (D) Метильная группа в тиазольном кольце допускает две молекулы 8, чтобы связаться с dCK; одна в положение-1 и одна в положение-2. В положении-1 мы наблюдаем только R-изомер (8R-P1; Fo-Fc, пренебрегая отображением, контурированным при 2 сигма). Теоретическая модель S-изомера в положении-1 отчетливо демонстрирует, что только R-изомер соответствует электронной плотности (стрелка). (E) В положении-2 мы наблюдаем только S-изомер (8S-P2; Fo-Fc, пренебрегая отображением, контурированным при 1,5 сигма). Теоретическая модель R-изомера в положении-2 отчетливо демонстрирует, что только S-изомер соответствует электронной плотности (стрелка);

фиг. 6 - R-изомер является соответствующим изомером по отношению к ингибированию dCK. (A) Схематическое изображение соединений 9S, 9R и 10R (R или S обозначает хиральность метиленового углерода линкера; стрелка указывает на добавленную метильную группу). (B) Свойства in vitro (IC_{50}^{app} и K_i^{app}) и в клетке (IC_{50}) для 9S, 9R и 10R. R-изомер как 9, так и 10 является ответственным за наблюдаемое ингибирование фермента. (C) dCK кристаллизовали в присутствии энантиомерно чистого 10R, и устанавливали структуру комплекса фермент-ингибитор. Fo-Fc, пренебрегая отображением (1,6 сигма) для положения-1 сайта связывания отчетливо показывает присутствие 10R. Несмотря на тиазольную метильную группу в 10R (которая совместима с молекулами, которые также связываются с положением-2), мы не наблюдаем второй 10R молекулы в положение-2. Это согласуется с результатами для соединения 8 (фиг. 5), которые показали, что только S-изомер связывается с положением-2;

фиг. 7 - хиральная селективность обуславливается конформационным отбором по сайту связывания фермента. (A) Наблюдаемое связывание ингибитора 8R в положение-1 (8R-P1) принимает конформацию, которая диктуется положением-1 сайта связывания. В данной конформации расстояние между хиральной метильной группой линкера и метильной группой тиазольного кольца составляет 4,2 Å. (B) Теоретическая модель 8S связывания с той же конформацией, как 8R в положении-1 (8S-P1), показывает, что гомологическое расстояние уменьшается до 2,5 Å. (C) Наблюдаемое связывание ингибитора 8S в положение-2 (8S-P2) принимает конформацию, которая диктуется положением-2 сайта связывания. В данной конформации расстояние между хиральной метильной группой линкера и метильной группой тиазольного кольца составляет 4,4 Å. (D) Теоретическая модель 8R связывания с той же конформацией, как 8S в положении-2 (8R-P2), показывает, что гомологическое расстояние уменьшается до 2,6 Å. (E) Для 8R-P1, наблюдаемый торсионный угол между тиазольным кольцом и линкером составляет -59°. Сканирование возможных торсионных углов показывает, что данная величина соответствует низкоэнергетической конформации 8R. (F) Для 8S-P1 наблюдаемый торсионный угол составляет 189°. Данная величина соответствует высокоэнергетической конформации. (G) Для 8S-P2 наблюдаемое торсионный угол составляет -326°. Сканирование возможных торсионных углов показывает, что данная величина соответствует низкоэнергетической конформации 8S. (H) Для 8R-P2 наблюдаемое торсионный угол составляет 147°. Данная величина соответствует высокоэнергетической конформации;

фиг. 8 - in vivo оценка соединения 10. (A) Количественное определение PET пробы, ^{18}F-L-FAC, эффективность всасывания в печени C57B1/6 самок мышей, обработанных соединениями 10 (25 мг/кг) путем внутрибрюшинной инъекции. Доза препарата: 50% ПЭГ/Трис, pH 7,4. Данные представляют собой средние значения ±SEM для по меньшей мере n = 5 мышь/момент времени. (B) Фармакокинетический профиль соединения 10 в плазме. C57B1/6 самкам мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции 50 мг/кг соединения 10, сформулированного в 50 % ПЭГ/Трис, pH 7,4. Данные представляют собой средние значения ±SEM для n = 4 мышей/момент времени;

фиг. 9 - связывание Ia с dCK человека. A) Ленточная диаграмма dCK мономера с наблюдаемой молекулой Ia, связанной (кружочки) в активном сайте. Нуклеотид UDP также присутствовал в комплексе. B) Взаимодействия между Ia и dCK. dCK остатки, делающие вклад во взаимодействие с Ia, (палочки) представлены как палочки. Полярные взаимодействия представлены как пунктирные черные линии;

фиг. 10 - Fo-Fc отображение, контурированное при 3 сигма вокруг соединения 2 из протомера A. Соединение 2 было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. Данный ингибитор связывается как две молекулы в активном сайте dCK в положении-1 и -2 и обозначается 2-P1 и 2-P2 соответственно;

фиг. 11 - Fo-Fc отображение, контурированное при 2,5 сигма вокруг соединений 3 и 4 из протомера A. A) Соединение 3 было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. B) То же самое для соединения 4;

фиг. 12 - Fo-Fc отображение, контурированное при 2,0 сигма вокруг соединений 5 и 6 из протомера A. A) Соединение 5 было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. B) То же самое для соединения 6;

фиг. 13 - Fo-Fc отображение, контурированное при 2,0 сигма вокруг соединений 7 и 8 из протомера A. A) Соединение 7 было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. B) То же самое для соединения 8. Данный ингибитор связывает две молекулы в активном сайте dCK. Благодаря присутствию хиральному углероду в линкере и использова-

нию рацемической смеси мы наблюдаем связывание R энантиомера в положение-1 (8R-P1) и связывание S энантиомера в положение-2 (8S-P2);

фиг. 14 - относительная ориентация 8R и 8S колец при dCK связывании. A) 8R/8S, как видно в структуре. B) 8S накладывается на 8R исходя из пиримидинового кольца. Обратите внимание на различные относительные ориентации тиазольного и фенильного колец между 8R и 8S;

фиг. 15 - относительная ориентация 8R и 8S, оптимизированная в растворе, по сравнению с ориентацией 8R, связанная в положение 1 в кристаллической структуре. Структуры выравнивают в соответствии с тиазольнми кольцами. Это иллюстрирует конформационное изменение, которое должно произойти для молекулы, чтобы выйти из раствора и связаться с белком. Как 8R, так и 8S подвергаются потере энергии, подвергаясь данному конформационному изменению, но потеря для 8R значительно меньше, чем потери для 8S;

фиг. 16 - реутилизация дезоксицитидина (dC) с помощью dCK предотвращает тимидин (dT)-индуцированный летальный репликационный стресс (RS) в T-ALL клетках. (A) Аллостерический контроль DNP дЦТФ продуцирования dT с помощью dTTP. RNR: рибонуклеотидредуктаза. (B) Эффекты от dT обработки (24 ч) на дЦТФ и dTTP пулы. Значения представляют собой средние величины ±SEM. (C) Анализ CEM клеточного цикла после обработки носителем или dT (50 мкМ) -/+ 2,5 мкМ dC в течение 24 ч. (D) Анализ CEM клеточного цикла после обработки гидроксимочевиной (50 мкМ), 5-фторурацилом (15 мкМ) или цисплатином (1,6 мкМ) в течение 24 ч -/+ 2,5 мкМ dC. (E) Анализ типичных иммуноблотов dCK и экспрессии актина и (F) dCK киназы в CEM dCK^{wt} (скремблированная кшРНК) клетках и dCK^{low} (кшРНК против dCK) клетках. Значения представляют собой средние величины ±SEM, *** P<0,001 (G) дЦТФ уровни в CEM dCK^{wt} и dCK^{low} клетках, обработанных в течение 24 ч носителем или dT (50 мкМ) -/+ dC (2,5 мкМ). Значения представляют собой средние величины ±SEM, *** P<0,001 (H) Анализ клеточного цикла CEM dCK^{low} клеток, обработанных носителем или dT (50 мкМ) -/+ 2,5 мкМ dC в течение 24 ч. (I) Типичные иммуноблоты, детектирующие Chk1, pChk1 (Ser345), Chk2, pChk2 (Thr68), dCK и актин в CEM dCK^{wt} и dCK^{low} клетках, обработанных носителем или dT (50 мкМ) в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24, 48 и 72 ч. (J) Содержание pH2A.X (Ser139) и ДНК (DAPI) в CEM dCK^{wt} и dCK^{low} клетках, обработанных носителем или dT (50 мкМ) в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24 ч. (K) Типичные изображения и количественное определение COMET анализа, который проводили на CEM dCK^{wt} и dCK^{low} клетках через 48 ч после обработки носителем или dT (50 мкМ) в присутствии 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средние величины момента хвоста по Оливе ±SEM из 100 клеток на изображение × 4 изображения/группу; n=2 независимые эксперименты. *** P<0,001. Накопление: 4×. (L) Окрашивание аннексином V CEM dCK^{wt} и dCK^{low} клеток после обработки носителем, dC (2,5 мкМ), dT (50 мкМ) или dC + dT в течение 72 ч. Все значения представляют собой средние величины ±SEM от по меньшей мере трех повторений/точка данных. *** P<0,001. Все данные на фиг. 1 являются типичными для n=3 независимых экспериментов, если не указано другое;

фиг. 17 - обработка dT запускает метаболический переход на NSP-опосредованный дЦТФ биосинтез в T-ALL клетках и повышающе регулирует NSP. (A) Схема подхода введения стабильной изотопной метки [U-^{13}C]-глюкозы и [U-^{13}C/^{15}N]-дезоксицитидина (dC), которую используют для определения источника (DNP или NSP) из не содержащего дЦТФ пула и дЦТФ, введенного в ДНК CEM клеток, обработанных разными концентрациями dT. (B) дЦТФ, полученные от [U-^{13}C]-глюкозы (DNP) и [U-^{13}C/^{15}N]-dC (NSP) в не содержащем дЦТФ пуле, и введенные в ДНК CEM клеток через 12 ч после инкубирования с предшественниками DNP и NSP с введенной стабильной изотопной меткой, в присутствии или в отсутствие dT. Значения представляют собой среднюю величину абсолютной площади пика/10^3 клеток ±SEM, * P< 0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, по сравнению с 0 мкМ dT контроля. Данные являются типичными для n=2 независимых экспериментов. (C) Количественное определение активности dCK киназы в CEM клетках в исходном состоянии и через 8 ч после обработки 50 мкМ dT. Данные являются типичными для n=2 независимых экспериментов. Значения представляют собой средние величины ±SEM, *** P<0,001. (D). Количественное определение захвата ^{3}H-меченного дезоксицитидина (dC) CEM клетками в исходном состоянии и через 4 ч после обработки 50 мкМ dT. Данные являются типичными для n=2 независимых экспериментов. Значения представляют собой средние величины ±SEM, *** P<0,001;

фиг. 18 - in vivo, реутилизация эндогенного dC освобождает T-ALL клетки от RS, индуцированной dT обработкой. (A) Левая ось: уровни dT в плазме у NSG мышей, обработанных dT (2 г/кг; одноразовая доза). Значения представляют собой средние величины ±SEM от n=3 мышей/момент времени; n=2 независимых экспериментов. Правая ось: концентрации dTTP от CEM dCK^{wt} и dCK^{low} опухолей в разные точки времени после обработки одноразовой дозой dT (2 г/кг); значения представляют собой средние величины ±SEM, n=4 мышей/момент времени; n=2 независимых эксперимента. (B) Типичный иммуноблот (n=3 независимые эксперименты), показывающий уровни pChk1 (Ser345) в разные точки времени в билатеральных с.к. CEM dCK^{wt} и dCK^{low} опухолей, имплантированных NSG мышам, обработанным dT (2 г/кг; одноразовая доза). (C) Концентрации дЦТФ CEM dCK^{wt} и dCK^{low} опухолей в разные точки времени после обработки одноразовой дозой dT (2 г/кг); значения представляют собой средние величины ±SEM, n=5 мышей/момент времени; n=2 независимых эксперимента. *** P<0,001. (D) Схема экспериментально-

го проекта для количественного определения инкорпорирования [U-^{13}C/^{15}N]-dC в ДНК dCK^{wt} и dCK^{low} CEM опухолей через 4 ч после обработки одноразовой дозой 2 г/кг dT или носителя. (E) Данные ЖХ/МС/МС-МРМ количественного определения инкорпорирования меченного дЦТФ в ДНК. Данные являются средними величинами ±SEM n=6 мышей/группа; n=2 независимых эксперимента. ** P<0,01. (F) Схема анализа in vivo PET активности dCK. (G) Захват ^{18}F-L-FAC в с.к. CEM dCK^{wt} и dCK^{low} ксенотрансплантатных опухолей через 4 х после инъекций носителя или dT. Значения представляют собой средний % снижения ^{18}F-FAC сигнала относительно dCK^{wt} носителя ±SEM, n=4 мышей/группа; n=2 независимых эксперимента. **P<0,01, ***P<0,001;

фиг. 19 - dCK является посредником резистентности к dT в T-ALL клетках in vivo. (A) Последовательные секретируемые измерения Gaussia люциферазы периферической крови у NSG мышей, несущих CEM dCK^{wt} или dCK^{low} с.к. опухолей (n=6 мышей/состояние), которые обрабатывают каждые 12 ч носителем или dT (2 г/кг), начиная с 7-го дня после имплантации опухоли до 13-го дня. Значения представляют собой средние величины ±SEM; n=2 независимых эксперимента. ** P< 0,01, ***P<0,001 по сравнению с dCK^{low} носителем в указанный момент времени (B) CEM dCK^{wt} и dCK^{low} опухоли от мыши из (A), обработанных носителем или dT. (C) Массы опухолей (мг) из (A). Значения представляют собой средние величины ±SEM; n=2 независимых эксперимента. ***P<0,001;

фиг. 20 - развитие DI-39, низкомолекулярный ингибитор dCK, который усиливается с ингибированием de novo биосинтеза дЦТФ в лейкозных клетках. (A) Схема, иллюстрирующая развитие DI-39, начиная со скрининга с высокой пропускной способностью (HTS) библиотеки из 90000 соединений, который предоставляет начальную дозу DI-0120. Дальнейшее соотношение структура-активность (SAR) дала 80 новых соединений, включая DI-39. (B) Химическая структура DI-39. (C) Измерения ЖХ/МС/МС-МРМ DI-39 в CEM клетках подвергали воздействию 1 мкМ лекарственного средства в течение указанных периодов времени. Клетки промывали три раза через 60 мин (обозначено вертикальной линией), и клеточное удержание лекарственного средства измеряли снова через 60 мин. Значения представляют собой средние величины ±SEM. (D) Значение IC_{50} для DI-39 определяли как % ингибирования захвата ^{3}H-dC uptake CEM клетками. Значения представляют собой средние величины ±SEM (E) 2,1 Å кристаллическая структура dCK со связанным DI-39 и уридин дифосфатом (UDP). (F) Внутриклеточные концентрации дЦТФ в культивированных CEM dCK^{wt} клетках, обработанных носителем, dT (50 мкМ), DI-39 (1 мкМ) или DI-39 + dT в течение 24 ч. Значения представляют собой средние величины ±SEM; n=2 независимых эксперимента. *** P<0,001. (G) Типичные иммуноблоты, детектирование Chk1, pChk1 (Ser345) и актина в CEM клетках, обработанных носителем, dT (1 мМ), DI-39 (100 нМ) или DI-39 + dT в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24 ч. (H) Окрашивание аннексином V CEM клеток, обработанных в течение 72 ч указанными концентрациями DI-39 и dT в присутствии 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средние величины ±SEM; n=2 независимых эксперимента, *** P<0,001 по сравнению с 50 мкМ dT. (I) Окрашивание аннексином V L1210-10 dCK нулевых клеток, обработанных в течение 72 ч указанными концентрациями DI-39. Значения представляют собой средний % положительного окрашивания клеток для аннексина V ±SEM; n=2 независимых эксперимента. (J). Типичные иммуноблоты Jurkat, MOLT-4, RSR4; 11, NALM-6 и TF-1 лейкозных клеток, обработанных носителем, dT (1 мМ), DI-39 (100 нМ) или DI-39 + dT в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24 ч (NALM-6) или в течение 72 ч (Jurkat, MOLT-4, RSR4; 11, TF-1). (K) Окрашивание аннексином V той же панели линий лейкозных клеток как в (J), обработанных в течение 72 ч носителем, dT (1 мМ), DI-39 (100 нМ) или DI-39 + dT. Культуры были дополнены 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средний % положительного окрашивания клеток для аннексина V ±SEM; n=3 независимых эксперимента. * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001;

фиг. 21 - DI-39 ингибирует dCK активность in vivo, как определено по ^{18}F-FAC PET, и способствует RS при комбинировании с dT (A) Фармакокинетический профиль DI-39. C57B1/6 мышам дозировали DI-39 путем внутрибрюшинной инъекции. Доза препарата: 10% ДМСО и 40% каптизол (SBE-P-CD, полианионный переменно замещенный сульфобутиловый простой эфир β-циклодекстрина, (Stella and He, 2008) в воде. Приблизительные значения площади под кривой (AUC), почечный клиренс (CL), время полувыведения ($T_{1/2}$), максимальная концентрация в плазме (C_{max}) и время досягаемости максимальной концентрации (T_{max}) рассчитывали используя Boomer/Multi-Forte PK функции для Microsoft Excel. Значения представляют собой средние величины ±SD, n=4/точка времени; n=2 независимых эксперимента. (B) ЖХ/МС/МС-МРМ количественное определение концентраций DI-39 в плазме и CEM опухолях в разные точки времени после обработки. См. способы для деталей. Значения представляют собой средние величины ±SD, n=4/группу. (C) Схематическая иллюстрация ^{18}F-FAC PET/CT исследования, чтобы определить in vivo dCK ингибирование DI-39 в ксенотрансплантатах CEM с.к. (D) Период действия in vivo ^{18}F-FAC PET/CT сканирует для определения dCK ингибирования DI-39 (единственная внутрибрюшинная инъекция, 50 мг/кг). Значения представляют собой средние % снижения сигнала ^{18}F-FAC ±SD, n=4 мышей/группа; n=2 независимых эксперимента. (E) % инкорпорирования [U-^{13}C/^{15}N]-dC в ДНК ксенотрансплантатов CEM через 5,5 ч после одноразовой обработки носителем, DI-39 (50 мг/кг), dT (2 г/кг) или DI-39 + dT; мыши были активированными стабильным изотопно меченным dC в течение 30 мин перед умерщвлением. Значения представляют собой средние величины ±SEM, n=4/группа; n=2 независимых

эксперимента. ** P<0,01, *** P<0,001. (F) Типичные иммуноблоты pChk1 (Ser345), Chk1, и актина в тканях опухоли, собранные у мышей через 6 ч после обработки DI-39 (50 мг/кг), dT (2 г/кг) или обеими агентами; n=3 независимых эксперимента;

фиг. 22 - фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP и NSP дЦТФ продуцирование является эффективным против T-ALL клеток in vivo (A) Типичные изображения ксенотрансплантатов CEM, выделенные из мышей, обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг) или DI-39 + dT каждые 12 ч, начиная с 7 дня после инокуляции и продолжая до 14 дня. n=6 мышей/группа; n=2 независимых эксперимента. (B) Массы опухолей из (A). Значения представляют собой средние величины ±SEM; n=2 независимых эксперимента, n=6 мышей/группа. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001. (C) Типичные изображения и количественное определение окрашивания образцов опухолей из (A). Накопление: 20×. Значения представляют собой средние величины ±SEM. n=6 мышей/группа. *** P<0,001. (D) Типичные FACS графики и количественное определение eGFP+ CEM лейкозных клеток в костном мозге у NSG мышей, обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг) или DI-39 + dT. Мышей (n=6/группа) обрабатывали каждые 12 ч, начиная с 3 дня после инокуляции с $1,0\times10^6$ CEM клетками. Значения представляют собой средние величины ±SEM; n=2 независимых эксперимента. **P<0,01 ***P<0,001;

фиг. 23 - фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP и NSP является эффективным против первичных мышиных $p185^{BCR-ABL}$ Arf $^{-/-}$ Pre-B ALL клеток, принимая во внимание умеренный гематопоэтический пул клетки-предшественника. (A) Окрашивание аннексином V $p185^{BCR-ABL}$ Arf $^{-/-}$ пре-B клеток через 48 ч после обработки носителем, dT (200 мкМ), DI-39 (100 нМ), или DI-39 + dT в присутствии 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средние величины ±SEM; n=2 независимых эксперимента. ** P<0,01. (B) Типичные биолюминесцентные изображения (BLI) мышей (n=6/группа), обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг) или DI-39 + dT на 14 день после внутривенной инъекции $2,0\times10^4$ пре-B лейкозных клеток/мышь. (C) Количественное определение BLI из BM и селезенки. * P<0,05, ** P<0,01. (D) Типичные FACS анализы и количественное определение CD19+ лейкозных клеток в BM обработанных мышей. ** P<0,01, *** P<0,001. (E) Количественное определение популяций клеточной линии" $Sca\text{-}1^+$ $c\text{-}Kit^+$ (LSK) из обработанных мышей. ** P <0,01. (F) LSK клетки из BM обработанных мышей анализировали касательно экспрессии CD34 и Flt3, чтобы идентифицировать и количественно определить долговременную (LT, $CD34^-$, $Flt3^-$), кратковременную (ST, $CD34^+$, $Flt3^-$), и полипотентную клетку-предшественник (MPP, $CD34^+$, $Flt3^+$) стволовых клеток. (G) Измерения массы тела, а также RBC, гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов (H) от NSG мышей (n=6/группа), обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг), или DI-39 + dT каждые 12 ч в течение 7 дней. Данные представляют собой средние величины ±SEM. Все данные представлены по меньшей мере двум независимым экспериментам;

фиг. 24 - оценка потенциальной токсичности DI-39/dT комбинированной терапии и модели. (A) Типичное FACS окрашивание pH2A.X и данные количественного определения в EryA ($CD71^+$/ высокое рассеяние в направлении распространения) эритробластах, чтобы оценить эндогенный (для $dCK^{-/-}$ мышей, n=4 мышей/группа) или потенциальный фармакологически-индуцированный (DI-39 + dT) генотоксический стресс. NSG мышей (n=5 мышей/группа) обрабатывали носителем или комбинацией DI-39 (50 мг/кг) и dT (2 г/кг) каждые 12 ч в течение 8 дней. Значения представляют собой средние величины ±SEM. ** P<0,01. (B) Типичные FACS графики и количественное определение микроядерных эритроцитов, свидетельствующие об эндогенном (для $dCK^{-/-}$мышей) или потенциальном фармакологически-индуцированном (DI-39 + dT) генотоксическим стрессом. Значения представляют собой средние величины ±SEM из n=2 независимых экспериментов. * P<0,05, *** P<0,001. (C, D) Предполагается логическое обоснование для объяснения селективности комбинированной терапии для лейкозных клеток по сравнению с нормальными гематопоэтическими клетками-предшественниками (см. текст для деталей);

фиг. 25 - стратегия FACS пропускания сигналов для идентификации популяций гематопоэтической клетки-предшественника, количественно определяемых на фиг. 23E и F;

фиг. 26 - структуры и значения IC_{50}, определенные с использованием анализа ^{3}H-dC захвата в L1210 клетках для начальных HTS доз (1 и 2) и для коммерчески доступных соединений, содержащих подобные структурные остовы (3-7);

фиг. 27 - связывание 15a с dCK человека. (A) Ленточная диаграмма мономера dCK с двумя наблюдаемыми молекулами 15a, связанными (кружочки) в активном сайте. Нуклеотид UDP также присутствовал в комплексе. (B) Взаимодействия между 15a и dCK. Полярные взаимодействия показаны как пунктирные линии. Две фосфатные группы UDP (сверху справа) демонстрируют относительную ориентацию 15a-I и 15a-II к нуклеотиду. (C) Метильная группа 15a-I и 15a-П тиазольного кольца (стрелки) укладываются одна против другой, занимая гидрофобный карман;

фиг. 28 - (A) полный термодинамический цикл, касающийся энергий связывания с отклонением молекулы A к молекуле B. $\Delta G_{белка}(A\rightarrow B)$ обозначает изменение свободной энергии при отклонении A к B в сольватированном комплекса ингибитор-белок, тогда как $\Delta G_{воды}(A\rightarrow B)$ обозначает изменение свободной энергии, когда отклонение происходит только в воде. Разница в свободных энергиях связывания, $\Delta\Delta G_{связывание}$, равняется изменению свободной энергии, когда молекула A связывается с белком

[ΔGсвязывание(A)], которая отнимается от изменения свободной энергии, когда молекула B связывается [ΔGсвязывание(B)]. Поскольку сумма всех компонентов в полном термодинамическом цикле должна равняться нулю, поэтому ΔΔGсвязывание также является эквивалентным ΔGбелка(A→B) - ΔGводы(A→B). (B) Компьютерная модель соединения 15c в комплексе с dCK. Остатки кармана связывания Glu 53, Gln 97, Arg 114, и Asp 133 показаны в явной форме, тогда как остаток белка иллюстрируется как ленточная структура. (C) Изменения свободной энергии (ккал/моль), ассоциированной с отклонением алкильной цепи в 5-положение тиазола. ΔGбелка представляет собой изменение свободной энергии для сольватированного комплекса ингибитор-белок. ΔGводы представляет собой изменение свободной энергии для ингибитора в только воде. Изменение свободной энергии при связывании обозначается как ΔΔGсвязывание;

фиг. 29 - оценка in vivo ингибиторов dCK с помощью PET анализа. (A) Схема механизма, по которому ^{18}F-L-FAC аккумулируется в dCK экспессирующих клетках. (B) Типичные аксиальные изображения ^{18}F-L-FAC PET/CT сканы печени C57B1/6 мышей, обработанных соединениями 15a, 36 и 37. (C) Количественное определение ^{18}F-L-FAC захвата в печени для образца ингибиторов с низкой наномолярной in vitro эффективностью. Данные представляют собой средние значения ±SEM по меньшей мере для n = 3 мышей/группа. *, P < 0,03. (D) Типичные изображения и количественное определение ^{18}F-L-FAC PET/CT сканов CCRF-CEM опухоли, которые несут NSG мыши, которые обрабатывали носителем, или соединением 36. Данные представлены как прямоугольный и точечный графики для, по меньшей мере, n = 4 мышей/группа. *, P < 0,0012;

фиг. 30 - фармакокинетический профиль соединения 36. C57B1/6 самкам мышей дозировали соединение 37 путем внутрибрюшинной инъекции. Доза препарата: 10% ДМСО и 40% Каптизол в воде. Данные представляют собой средние значения ±SEM для n = 4 мышей/момент времени;

фиг. 31 - кристаллическая структура dCK:36 комплекса. (A) Ленточная диаграмма dCK мономера с единичной наблюдаемой молекулой 36, связанной (кружочки) в активном сайте. Нуклеотид UDP (кружочки) также присутствовал в комплексе. (B) Подробности взаимодействий между 36 и dCK. dCK остатки включены в полярные и гидрофобные взаимодействия с 36. Полярные взаимодействия показаны как пунктирные черные линии.

Подробное описание сущности изобретения

Сокращения, использованные в данном документе, имеют свое общепринятое значение в химической и биологической областях. Химические структуры и формулы, представленные в данном документе, составлены в соответствии со стандартными правилами химической валентности, известными в химической области.

Там, где группы заместителей определяются их общепринятыми химическими формулами, написанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые будут получены в результате написания структуры справа налево, например $-CH_2O-$ эквивалентно $-OCH_2-$.

Термин "алкил", сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, линейную (т.е. неразветвленную) или разветвленную углеродную цепь (или углерод), или их комбинацию, которая может быть полностью насыщенной, моно- или полиненасыщенной и может включать одно-, двух- и многовалентные радикалы, имеющие определенное количество атомов углерода (т.е. C_1-C_{10}- означает от одного до десяти углеродов). Алкил представляет собой нециклизованную цепь. Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают, но не ограничиваются этим, группы, такие как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, (циклогексил)метил, гомологи и изомеры, например н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и им подобный. Ненасыщенная алкильная группа представляет собой алкильную группу, имеющую одну или больше двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются этим, винил, 2-пропенил, кротоновую группу, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил, и высшие гомологи и изомеры. Алкокси представляет собой алкил, присоединенный к остатку молекулы через кислородный линкер (-O-).

Термин "гетероалкил", сам по себе или в комбинации с другим термином означает, если не указано иное, стабильную линейную или разветвленную цепь или их комбинации, включая по меньшей мере один атом углерода и по меньшей мере один гетероатом, выбранный из группы, состоящей из O, N, P, Si и S, и где атомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизированным. Гетероатом(ы) O, N, P, S, B, As и Si могут быть расположены в каком-либо внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильная группа присоединена к остатку молекулы. Гетероалкил представляет собой нециклизованную цепь. Примеры включают, но не ограничиваются этим: $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2$, $-S(O)CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, $-CH=CH-N(CH_3)CH_3$, $-O-CH_3$, $-O-CH_2-CH_3$ и -CN. Вплоть до двух или трех гетероатомов могут следовать друг за другом, так как, например, $-CH_2-NH-OCH_3$ и $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$.

Термины "циклоалкил" и "гетероциклоалкил", сами по себе или в комбинации с другими термина-

ми, означают, если не указано иное, циклические варианты "алкила" и "гетероалкила" соответственно. Циклоалкил и гетероалкил не являются ароматическими. Кроме того, для гетероциклоалкила, гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединяется к остатку молекулы. Примеры циклоалкила включают, но не ограничиваются этим, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и аналогичные. Примеры гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются этим, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиен-2-ил, тетрагидротиен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил, и аналогичные. "Циклоалкилен" и "гетероциклоалкилен" сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из циклоалкила и гетероциклоалкила соответственно.

Термины "гало" или "галоген" сами по себе или как часть другого заместителя означают, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или йода. Кроме того, термины, такие как "галогеналкил", предназначены для включения моногалогеналкила и полигалогеналкила. Например, термин "галоген(C_1-C_4)алкил" включает, но не ограничивается этим, фторметил, дифторметил, трифторметил, 2,2,2-трифторэтил, 4-хлорбутил, 3-бромпропил и аналогичные.

Термин "ацил" означает, если не указано иное, -C(O)R, где R представляет собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

Термин "арил" означает, если не указано иное, полиненасыщенный, ароматический, углеводородный заместитель, который может представлять собой одно кольцо или несколько колец (предпочтительно от 1 до 3 колец), которые анелированы вместе (т.е. анелированный кольцевой арил) или связаны ковалентно. Анелированный кольцевой арил касается нескольких колец, анелированных вместе, в которых по меньшей мере одно из анелированных колец является арильным кольцом.

Термин "гетероарил" касается арильных групп (или колец), которые содержат по меньшей мере один гетероатом, такой как N, O, или S, где атомы азота и серы необязательно окислены, и атом(ы) азота необязательно являются кватернизированным(ыми). Таким образом, термин "гетероарил" включает анелированные колцевые гетероарильные группы (т.е. несколько колец, анелированных вместе, где по меньшей мере одно из анелированных колец является гетероароматическим кольцом). 5,6-Анелированный кольцевой гетероарилен касается двух колец, анелированных вместе, где одно кольцо имеет 5 членов и другое кольцо имеет 6 членов и где по меньшей мере одно кольцо представляет собой гетероарильное кольцо. Аналогичным образом, 6,6-анелированный кольцевой гетероарилен касается двух колец, анелированных вместе, где одно кольцо имеет 6 членов и другое кольцо имеет 6 членов и где по меньшей мере одно кольцо представляет собой гетероарильное кольцо. И 6,5-анелированный кольцевой гетероарилен касается двух колец, анелированных вместе, где одно кольцо имеет 6 членов и другое кольцо имеет 5 членов и где по меньшей мере одно кольцо представляет собой гетероарильное кольцо. Гетероарильная группа может присоединяться к остатку молекулы через углерод или гетероатом. Неограничивающие примеры арильных и гетероарильных групп включают фенил, нафтил, пирролил, пиразолил, пиридазинил, триазинил, пиримидинил, имидазолил, пиразинил, пуринил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, фурил, тиенил, пиридил, пиримидил, бензотиазолил, бензоксазоил, бензимидазолил, бензофуран, изобензофуранил, индолил, изоиндолил, бензотыофенил, изохинолил, хиноксалинил, хинолил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-бифенил, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждого из указанных выше арильных и гетероарильных кольцовых систем выбирают из группы приемлемых заместителей, описанных ниже. "Арилен" и "гетероарилен" сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из арила и гетероарила соответственно. Заместитель гетероарильной группы может быть -O-связанным с кольцевым гетероатомом азота.

Термин "оксо", как используется в данном документе, означает кислород, который связан с атомом углерода двойной связью.

Каждый из указанных выше терминов (например, "алкил," "гетероалкил," "арил", и "гетероарил") включает как замещенные, так и незамещенные формы указанного радикала. Предпочтительные заместители для каждого типа радикала представлены ниже.

Заместители для алкильных и гетероалкильных радикалов (включая те группы, что часто именуются как алкилен, алкенил, гетероалкилен, гетероалкенил, алкинил, циклоалкил, гетероциклоалкил, циклоалкенил и гетероциклоалкенил) могут быть одним или больше из разновидности групп, выбранных из, но не ограничивающихся этим, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -галогена, -SiR'R'R", -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R", -NR"$C(O)_2$R', -NR-C(NR'R"R'")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR'", -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R", -$NRSO_2$R', -NR'NR"R", -ONR'R", -NR'C=

(O)NR"NR'"R"", -CN, $-NO_2$, $-NR'SO_2R"$, -NR'C=(O)R", -NR'C(O)OR", -NR'OR", в числовом диапазоне от нуля до (2m'+1), где m' - это общее количество атомов углерода в таком радикале. R, R', R", R'" и R"" каждый предпочтительно независимо обозначает водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил (например, арил, замещенный 1-3 галогенами), замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный алкил, алкокси или тиоалкокси группы или арилалкильные группы. Когда соединение согласно изобретению включает больше, чем одну R группу, например каждую из R групп независимо выбирают, поскольку каждая является R, R", R'" и R"" группой, когда присутствует больше, чем одна из данных групп. Когда R' и R" присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 4-, 5-, 6- или 7-членного кольца. Например, -NR'R" включает, но не ограничивается этим, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из приведенного выше обсуждения заместителей квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что термин "алкил" предназначен для включения групп, включая атомы углерода, связанные с группами другими, чем атом водорода, такими как галогеналкил (например, $-CF_3$ и $-CH_2CF_3$) и ацил (например, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ и аналогичные).

Аналогичные заместителям, описанным для алкильного радикала, заместители для арильных и гетероарильных групп являются разнообразными и выбранными из, например: -OR', -NR'R", -SR', -галогена, -SiR'R"R", -OC(O)R', -C(O)R', $-CO_2R'$, -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R'", $-NR"C(O)_2R'$, -NR-C(NR'R"R'")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR'", $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, $-NRSO_2R'$, -NR'NR"R'", -ONR'R", -NR'C=(O)NR"NR'"R"", -CN, $-NO_2$, -R', $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, фтор(C_1-C_4)алкокси и фтор(C_1-C_4)алкила, $-NR'SO_2R"$, -NR'C=(O)R", -NR'C(O)OR", -NR'OR", в числовом диапазоне от нуля до общего количества открытых валентностей в ароматической кольцевой системе; и где R', R", R'" и R"" предпочтительно независимо выбирают из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила, и замещенного или незамещенного гетероарила. Когда соединение согласно изобретению включает больше, чем одну R группу, например, каждую из R группы независимо выбирают, поскольку каждая является R', R", R'" и R"" группами, когда присутствует больше, чем одна из данных групп.

Заместители для колец (например, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкилена, гетероциклоалкилена, арилена или гетероарилена) могут быть изображены как заместители в кольце, а не на конкретном атоме кольца (которые принято называть плавающим заместителем). В таком случае заместитель может быть присоединен к какому-либо из атомов кольца (подчиняясь правилам химической валентности) и в сучае анелированных колец или спироциклических колец, заместитель, изображенный как связанный с одним членом анелированных колец или спироциклических колец (плавающий заместитель на одном кольце), могут быть заместителем на каком-либо из анелированных колец или спироциклических колец (плавающий заместитель на нескольких кольцах). Когда заместитель присоединяется к кольцу, но не к конкретному атому (плавающий заместитель), и нижний индекс для заместителя представляет собой целое число больше единицы, несколько заместителей могут быть на одном и том же атоме, в одном и том же кольце, на разных атомах, в разных анелированных кольцах, в разных спироциклических кольцах, и каждый заместитель необязательно может быть разным. Когда точка присоединения кольца к остатку молекулы не ограничивается одним атомом (плавающий заместитель), точка присоединения может быть каким-либо атомом кольца, и в сучае анелированного кольца или спироциклического кольца, какой-либо атом какого-либо из анелированных колец или спироциклических колец, одновременно подчиняясь правилам химической валентности. Когда кольцо, анелированные кольца или спироциклические кольца содержат один или больше кольцевых гетероатомов, и кольцо, анелированные кольца, или спироциклические кольца показаны с одним или больше плавающими заместителями (включая, но не ограничиваясь этим, точки присоединения к остатку молекулы), плавающие заместители могут быть связаны с гетероатомами. Когда кольцевые гетероатомы показаны связанными с одним или больше водородами (например, кольцевой азота с двумя связями с кольцевыми атомами и третья связь с водородом) в структуре или формула с плавающим заместителем, где гетероатом связан с плавающим заместителем, будет понятно, что заместитель замещает водород, одновременно подчиняясь правилам химической валентности.

Два или больше заместителей необязательно могут соединяться с образованием арильных, гетероарильных, циклоалкильных или гетероциклоалкильных групп. Такие так называемые образующие кольцо заместители, как правило, хотя необязательно, обнаруживаются присоединенными к циклической базовой структуре. В одном варианте реализации изобретения образующие кольцо заместители присоединяются к смежным членам базовой структуры. Например, два образующие кольцо заместителя, присоединенные к смежным членам циклической базовой структуры, создают анелированную кольцевую структуру. В другом варианте реализации изобретения образующие кольцо заместители присоединены к одному члену базовой структуры. Например, два образующих кольцо заместителя, присоединенные к одному члену циклической базовой структуры, создают спироциклическую структуру. В еще другом варианте реализации изобретения образующие кольцо заместители присоединены к несмежным членам базо-

вой структуры.

Два заместителя на смежных атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут образовывать кольцо формулы -T-C(O)-$(CRR')_q$-U-, где T и U независимо представляют собой -NR-, -O-, -CRR'- или простую связь, и q является целым числом от 0 до 3. Альтернативно, два заместителя на смежных атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут быть замещены на заместитель формулы -A-$(CH_2)_r$-B-, где A и B независимо представляют собой -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O) -, -$S(O)_2$-, -$S(O)_2$NR'-, или простую связь, и r является целым числом от 1 до 4. Одна из простых связей нового кольца, таким образом, образованного необязательно может быть замещенной на двойную связь. Альтернативно, два заместителя на смежных атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут быть замещенными на заместитель формулы -$(CRR')_s$-X'- $(C"R"R"')_d$-, где s и d независимо представляют собой целые числа от 0 до 3, и X' представляет собой -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -$S(O)_2$- или -$S(O)_2$NR'-. Заместители R, R', R" и R" предпочтительно независимо выбирают из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила и замещенного или незамещенного гетероарила.

Как используется в данном документе, термины "гетероатом" или "кольцевой гетероатом" предназначены, чтобы включать кислород (O), азот (N), серу (S), фосфор (P), бор (B), мышьяк (As) и кремний (Si).

"Группа заместителя", как используется в данном документе, означает группу, выбранную из следующих фрагментов:

(A) оксо, галогена, -CF_3, -CN, -OH, -NH_2, -COOH, -$CONH_2$, -NO_2, -SH, -SO_2Cl, -SO_3H, -SO_4H, -SO_2NH_2, -$NHNH_2$, -ONH_2, -NHC=(O)$NHNH_2$, -NHC=(O) NH_2, -$NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, -OCF_3, -$OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(B) C_1-C_6-алкила, гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(i) оксо, галогена, -CF_3, -CN, -OH, -NH_2, -COOH, -$CONH_2$, -NO_2, -SH, -SO_2Cl, -SO_3H, -SO_4H, -SO_2NH_2, -$NHNH_2$, -ONH_2, -NHC=(O)$NHNH_2$, -NHC=(O)NH_2, -$NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, -OCF_3, -$OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(ii) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(a) оксо, галогена, -CF_3, -CN, -OH, -NH_2, -COOH, -$CONH_2$, -NO_2, -SH, -SO_2Cl, -SO_3H, -SO_4H, -SO_2NH_2, -$NHNH_2$, -ONH_2, -NHC=(O)$NHNH_2$, -NHC=(O)NH_2, -$NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, -OCF_3, -$OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила, и

(b) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из оксо, галогена, -CF_3, -CN, -OH, -NH_2, -COOH, -$CONH_2$, -NO_2, -SH, -SO_2Cl, -SO_3H, -SO_4H, -SO_2NH_2, -$NHNH_2$, -ONH_2, -NHC=(O)$NHNH_2$, -NHC=(O)NH_2, -$NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, -OCF_3, -$OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила.

"Ограниченный по размеру заместитель" или "ограниченная по размеру группа заместителя", как используется в данном документе, означает группу, выбранную из всех заместителей, описанных выше для "группы заместителя", где каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный C_1-C_{20}-алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2-20-членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный C_3-C_8-циклоалкил, и каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3-8 членный гетероциклоалкил.

"Низший заместитель" или "группа низшего заместителя", как используется в данном документе, означает группу, выбранную из всех заместителей, описанный выше для "группы заместителя", где каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный C_1-C_8-алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2-8-членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный C_3-C_7-циклоалкил и каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3-7-членный гетероциклоалкил.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждая группа заместителя, описанная в соединениях в данном документе, является замещенной по меньшей мере одной группой заместителя. Более конкретно, в некоторых вариантах реализации изобретения каждый замещенный алкил, замещенный ге-

тероалкил, замещенный циклоалкил, замещенный гетероциклоалкил, замещенный арил, замещенный гетероарил, замещенный алкилен, замещенный гетероалкилен, замещенный циклоалкилен, замещенный гетероциклоалкилен, замещенный арилен и/или замещенный гетероарилен, описанный в соединениях в данном документе, является замещенным по меньшей мере одной группой заместителя. В других вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна или все из данных групп являются замещенными по меньшей мере одной ограниченной по размеру группой заместителя. В других вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна или все из данных групп являются замещенными по меньшей мере одной группой низшего заместителя.

В других вариантах реализации изобретения соединений в данном документе каждый замещенный или незамещенный алкил может представлять собой замещенный или незамещенный C_1-C_{20}-алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2-20-членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный C_3-C_8-циклоалкил, и/или каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3-8-членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах реализации изобретения соединений в данном документе, каждый замещенный или незамещенный алкилен представляет собой замещенный или незамещенный C_1-C_{20}-алкилен, каждый замещенный или незамещенный гетероалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 2-20 членный гетероалкилен, каждый замещенный или незамещенный циклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный C_3-C_8-циклоалкилен, и/или каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 3-8-членный гетероциклоалкилен.

В некоторых вариантах реализации изобретения, каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный C_1-C_8-алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2-8-членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный C_3-C_7-циклоалкил, и/или каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3-7-членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый замещенный или незамещенный алкилен представляет собой замещенный или незамещенный C_1-C_8-алкилен, каждый замещенный или незамещенный гетероалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 2-8-членный гетероалкилен, каждый замещенный или незамещенный циклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный C_3-C_7-циклоалкилен, и/или каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 3-7 членный гетероциклоалкилен.

Некоторые соединения, описанные в данном документе, имеют асимметричные атомы углерода (оптические или хиральные центры) или двойные связи; энантиомеры, рацематы, диастереомеры, таутомеры, геометрические изомеры, стереоизометные формы, которые могут быть определены, с точки зрения абсолютной стереохимии, как (R)- или (S)- или, как (D)- или (L)- для аминокислот, и индивидуальные изомеры охватываются объемом настоящего изобретения. Соединения согласно настоящему изобретению не включают те, которые, как известно в данной области, являются очень нестабильными при синтезе и/или выделении. Настоящее изобретение предназначено для включения соединений в рацемической и оптически чистой формах. Оптически активные (R)- и (S)-, или (D)- и (L)-изомеры могут быть получены, используя хиральные синтоны или хиральные реагенты, или получены, используя общепринятые способы. Когда соединения, описанные в данном документе, содержат олефиновые связи или другие центры геометрической асимметрии и, если не указано иное, предполагается, что соединения включают как E, так и Z геометрические изомеры.

Как используется в данном документе, термин "изомеры" касается соединений, имеющих одинаковое количество и вид атомов, и, следовательно, одинаковую молекулярную массу, но различающиеся, если речь идет о структурном расположении или конфигурации атомов.

Термин "таутомер", как используется в данном документе, касается одного из двух или больше структурных изомеров, которые существуют в равновесии, и которые легко превращаются из одной изомерной формы в другую.

Квалифицированному специалисту в данной области будет очевидно, что определенные соединения согласно данному изобретению могут существовать в таутомерных формах, где все такие таутомерные формы соединений находятся в пределах области изобретения.

Если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также предназначены, чтобы включать все стереохимические формы структуры; т.е. (R) и (S) конфигурации для каждого асимметричного центра. Таким образом, единичные стереохимические изомеры, а также энантиомерные и диастереомерные смеси представленных соединений, как правило, идентифицированы как стабильные квалифицированным специалистом в данной области, находятся в пределах области изобретения.

Если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также предназначены, чтобы включать соединения, которые отличаются только присутствием одного или больше изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие представленные структуры, за исключение случаев замещения водорода на дейтерий или тритий, замещения фторида на ^{18}F, или замещения углерода на ^{13}C-

или ^{14}C-обогащенный углерод, находятся в пределах области изобретения.

Соединения согласно настоящему изобретению также могут содержать неестественные количественные соотношения атомных изотопов в одном или больше из атомов, что составляют такие соединения. Например, соединения могут быть меченными радиоактивными изотопами, такими как, например, тритий (^{3}H), фторид (^{18}F), йод-125 (^{125}I), или углерод-14 (^{14}C). Все изотопные вариации соединений согласно настоящему изобретению, или радиоактивные или нет, охватываются пределами объема настоящего изобретения.

Символ "~~~"указывает точку присоединения химического фрагмента к остатку молекулы или химической формулы.

Когда фрагмент является замещенным R заместителем, группа может называться как "R-замещенный". Когда фрагмент является R-замещенным, фрагмент является замещенным по меньшей мере одним R заместителем, и каждый R заместитель является необязательно разным. Когда конкретная R группа присутствует в описании химического рода (такого как формула (I)), римский десятичный разделитель могут использовать для распознавания каждого вида данной конкретной R группы. Например, когда присутствует несколько R^{13} заместителей, каждый R^{13} заместитель могут распознавать как $R^{13,1}$, $R^{13,2}$, $R^{13,3}$, $R^{13,4}$ и т.д., где каждый из $R^{13,1}$, $R^{13,2}$, $R^{13,3}$, $R^{13,4}$ и т.д. определен в пределах объема определений R^{13} и необязательно иначе.

Описание соединений настоящего изобретения ограничивается принципами химической связи, известными квалифицированным специалистам в данной области. Соответственно, когда группа может быть замещенной одним или больше из числа заместителей, такие замещения выбирают таким образом, чтобы удовлетворять принципам химической связи и давать соединения, которые по своему определению не являются нестабильными и/или квалифицированному специалисту в данной области должно быть известно, что вероятно являются нестабильными в условиях окружающей среды, таких как водные, нейтральные и некоторые известные физиологические условия. Например, гетероциклоалкил или гетероарил присоединяется к остатку молекулы через кольцевой гетероатом в соответствии с принципами химической связи, известными квалифицированному специалисту в данной области, тем самым избегая по определению нестабильных соединений.

Термины "дезоксицитидинкиназа", "DCK", и "dCK" используются в данном документе взаимозаменяемо и в соответствии с их общим, обычным значением и касается белков одинаковых или подобных названий и функциональных фрагментов и их гомологов. Термин включает какую-либо рекомбинантную или встречающуюся в природе форму dCK (NP000779,1 GL4503269), или их варианты, которые сохраняют dCK активность (например, в пределах, по меньшей мере, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100% активности по сравнению с dCK).

Термин "фармацевтически приемлемые соли" предназначен для включения солей активных соединений, которые получают с относительно нетоксических кислот или оснований, в зависимости от конкретных заместителей, найденных в соединениях, описанных в данном документе. Когда соединения согласно настоящему изобретению содержат относительно кислотные функциональности, основные соли присоединения могут быть получены путем контактирования нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством нужного основания, или в чистом виде, или в приемлемом инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых основных солей присоединения включают соли натрия, калия, кальция, аммония, органического амина, или магния, или подобную соль. Когда соединения согласно настоящему изобретению содержит относительно основные функциональности, кислотные соли присоединения могут быть получены путем контактирования нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством нужной кислоты, или в чистом виде, или в приемлемом инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых кислотных солей присоединения включают те, которые получены из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, азотная, угольная, моногидрокарбонатная, фосфорная, моногидрофосфатная, дигидрофосфатная, серная, моногидросульфатная, йодистоводородная или фосфористая кислота и аналогичные, а также соли, полученные из относительно нетоксичных органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомасляная, малеиновая, малоновая, бензойная, янтарная, пробковую, фумаровая, молочная, миндальная, фталевая, бензолсульфоновая, п-толуолсульфоновая, лимонная, винная, щавелевая, метансульфоновая, и аналогичные. Также включенными являются соли аминокислот, такие как аргинат и аналогичные, и соли органических кислот, таких как глюкуроновая или галактуроновая кислота и аналогичные (см., например, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Некоторые конкретные соединения согласно настоящему изобретению содержат как основные, так и кислотные функциональности, что позволяет соединениям быть превращенными в или основные, или кислотные соли присоединения.

Таким образом, соединения согласно настоящему изобретению могут существовать как соли, такие как с фармацевтически приемлемыми кислотами. Настоящее изобретение включает такие соли. Примеры таких солей включают гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, метансульфонаты, нитраты, малеаты, ацетаты, цитраты, фумараты, тартраты (например, (+)-тартраты, (-)-тартраты, или их смеси, включая рацемические смеси), сукцинаты, бензоаты, и соли с аминокислотами, такими как глутаминовая кислота. Данные соли могут быть получены по способам, известным квалифицированным специалистам в данной

области.

Нейтральные формы соединений предпочтительно воспроизводятся путем контактирования соли с основанием или кислотой и выделения исходного соединения традиционным способом. Исходная форма соединения отличается от разных солевых форм с определенными физическими свойствами, такими как растворимость в полярных растворителях.

В дополнение к солевым формам настоящее изобретение предусматривает соединения, которые находятся в форме пролекарства. Пролекарства соединений, описанные в данном документе, включают такие соединения, которые легко претерпевают химические или ферментативные изменения в физиологических условиях, давая соединения согласно настоящему изобретению. Кроме того, пролекарства могут превращаться в соединения согласно настоящему изобретению химическими или биохимическими способами в ex vivo среде. Например, пролекарства могут медленно превращаться в соединения согласно настоящему изобретению, когда расположены в емкости трансдермального пластыря с приемлемым ферментом или химическим реагентом.

Определенные соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в несольватированных формах, а также в сольватированных формах, включая гидратированные формы. В общем, сольватированные формы эквивалентны несольватированным формам и охватываются объемом настоящего изобретения. Определенные соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в нескольких кристаллических или аморфных формах. В общем, все физические формы эквивалентны для использований, рассматриваемых настоящим изобретением, и предназначены, чтобы быть в пределах объема настоящего изобретения.

Как используется в данном документе, термин "соль" касается кислотных или основных солей соединений, используемых в способах согласно настоящему изобретению. Иллюстративные примеры приемлемых солей представляют собой соли минеральных кислот (соляной кислоты, бромистоводородной кислоты, фосфорной кислоты и аналогичных), соли органических кислот (уксусной кислоты, пропионовой кислоты, глутаминовой кислоты, лимонной кислоты и аналогичных), соли четвертичного аммония (метилйодид, этилйодид и аналогичные).

Термины "лечащий" или "лечение" касаются каких-либо признаков успеха в лечении или облегчении травмы, болезни, патологии или состояния, включая какой-либо объективный или субъективный параметр, такой как уменьшение симптомов; ремиссия; ослабления симптомов или делая травмы, патологии или состояния более терпимыми для пациента; замедление скорости дегенерации или ухудшения; делая конечную точку дегенерации менее тяжело переносимой; или улучшая физическое или психическое самочувствие пациента. Лечение или облегчение симптомов могут быть основаны на объективных или субъективных параметрах, включая результаты физического осмотра, психоневрологических обследований и/или психиатрической экспертизы. Термин "лечение" и связанные с ним действия включают предотвращение травмы, патологии, состояния или заболевания.

"Эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения поставленной цели (например, достижения эффекта, для которого оно вводится, лечения заболевания, снижения активности фермента, усиления активности ферментов, уменьшения одного или более симптомов заболевания или состояния). Пример "эффективного количества" означает количество, достаточное чтобы внести свой вклад в лечение, профилактику или уменьшение симптома или симптомов заболевания, которое также может быть названо как "терапевтически эффективное количество". "Уменьшение" симптома или симптомов (и грамматические эквиваленты данной фразы) означает снижение тяжести или частоты симптома(ов), или устранение симптома(ов). "Профилактически эффективное количество" лекарственного средства означает количество лекарственного средства, которое при введении субъекту будут иметь предполагаемый профилактический эффект, например предупреждение или задержка возникновения (или рецидива) травмы, заболевания, патологии или состояния, или снижения вероятности возникновения (или рецидива) травмы, заболевания, патологии или состояния, или их симптомов. Полный профилактический эффект не обязательно происходит при введении одной дозы и может иметь место только после введения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество могут вводить в один или больше приемов. Точные количества будут зависеть от цели лечения и будет устанавливаться квалифицированным специалистом в данной области, используя известные методики (см., например, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); и Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Для каких-либо соединений, описанных в данном документе, терапевтически эффективное количество первоначально может быть определено из анализов клеточной культуры. Целевые концентрации будут такими концентрациями активного(ых) соединения(ий), с которыми существует способность достижения способов, описанных в данном документе, как измерено с использованием способов, описанных в данном документе или известных в данной области.

Как хорошо известно в данной области, терапевтически эффективные количества для использования у людей также могут быть определены из моделей на животных. Например, доза для людей может быть сформулирована для достижения концентрации, которая, как найдено, является эффективной у жи-

вотных. Дозировку для людей могут регулировать путем мониторинга эффективности соединений, и регулирование дозы в сторону повышения или в сторону понижения, как описано выше. Регулирование дозы для достижения максимальной эффективности у людей на основании способов, описанных выше, и другие способы находятся в значительной степени в пределах возможностей обычного квалифицированного специалиста.

Дозы могут варьировать в зависимости от потребностей пациента и того, какое соединение применяют. Доза, вводимая пациенту, в контексте изобретения должна быть достаточной для реализации изобретения благоприятного терапевтического ответа у пациента с течением времени. Размер дозы также будет определяться существованием, природой и степенью каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Определение соответствующей дозы для конкретной ситуации находится в компетенции практикующего врача. Как правило, лечение начинают с меньших доз, которые меньше, чем оптимальная доза соединения. Впоследствии дозу увеличивают небольшими шагами пока не будет достигнут оптимальный эффект при определенных обстоятельствах.

Количества и интервалы дозирования могут регулироваться индивидуально, чтобы обеспечить уровни вводимого соединения, эффективные для конкретных клинических показаний, которые лечат. Это будет обеспечивать терапевтический режим, который является соответствующим тяжести болезненного состояния индивидуума.

Применение принципов, представленных в данном документе, эффективный профилактический или терапевтический режим лечения может планироваться таким образом, что не вызывает существенной токсичности, и еще является эффективным для лечения клинических симптомов, которые демонстрируются конкретным пациентом. Данное планирование должно включать тщательный выбор активного соединения, принимая во внимание факторы, такие как эффективность соединения, относительная биодоступность, масса тела пациента, наличие и тяжесть нежелательных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного агента.

"Контроль" или "контрольный эксперимент" используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается эксперимента, в котором субъекты или реагенты эксперимента обрабатывают как в параллельном эксперименте, за исключением опущения процедуры, реагента или переменной эксперимента. В некоторых случаях контроль используют как стандарт сравнения при оценке экспериментальных эффектов. В вариантах реализации изобретения контроль является измерением активности белка в отсутствие соединения, которое описано в данном документе (включая варианты реализации изобретения и примеры).

"Контактирование" используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается процесса, позволяющего по меньшей мере двум различным видам (например, химическим соединениям, включая биомолекулы или клетки) стать достаточно близкими, чтобы реагировать, взаимодействовать или физически соприкасаться. Следует иметь в виду, однако, что полученный в результате продукт реакции может быть получен непосредственно по реакции между добавленными реагентами или из промежуточного соединения из одного или больше добавленных реагентов, которые могут быть получены в реакционной смеси.

Термин "контактирование" может включать предоставление двух видов, чтобы реагировать, взаимодействовать или физически соприкасаться, где два вида могут представлять собой соединение, которое описано в данном документе, и белок или фермент. Контактирование может включать предоставление соединения, описанного в данном документе, чтобы взаимодействовать с белком или ферментом, который участвует в пути передачи сигнала.

Как определено в данном документе, термин "ингибирование", "ингибировать", "ингибирующий" и аналогичные в применении к взаимодействию белок-ингибитор означает негативно влияющий (например, снижающий) на активность или функцию белка по сравнению с активностью или функцией белка в отсутствие ингибитора. Ингибирование может касаться уменьшения заболевания или симптомов заболевания. Ингибирование может касаться уменьшения активности конкретного белка или нуклеиновой кислоты-мишени. Белок может быть дезоксицитидинкиназой. Таким образом, ингибирование включает, по меньшей мере, в некоторой мере частичное или общее блокирование стимуляции, уменьшения, предотвращения или задержки активации или инактивирование, десенсибилизирование или понижающее регулирование сигнальной трансдукции или ферментной активности или количества белка.

Термин "модулятор" касается композиции, что увеличивает или уменьшает уровень молекулы-мишени, или функции молекулы-мишени, или физическое состояние молекулы-мишени.

Термин "модулировать" используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается действия изменения или варьирования одного или больше свойств. "Модулирование" касается процесса изменения или варьирования одного или больше свойств. Например, модулятор белка-мишени изменяется путем увеличения или уменьшения свойства или функции молекулы-мишени, или количества молекулы-мишени. Модулятор заболевания снижает симптом, причину или характеристику целевого заболевания.

"Селективный" или "селективность" или подобное соединения касается способности соединения делать различия между молекулярными мишенями. "Специфический", "специфически", "специфич-

ность", или подобное соединения касается способности соединения вызывать определенное действие, такое как ингибирование, к конкретной молекулярной мишени с минимальным действием или без действия на другие белки в клетке.

"Фармацевтически приемлемый эксципиент" и "фармацевтически приемлемый носитель" касаются вещества, которое помогает введению активного агента и абсорбции субъектом, и могут быть включенными в композиции настоящего изобретения не вызывая значительного вредного токсикологического эффекта на пациента. Не ограничивающие примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают воду, NaCl, нормальные солевые растворы, раствор Рингера с лактатом, нормальную сахарозу, нормальную глюкозу, связующие вещества, наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, покрывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, растворы солей (такие как раствор Рингера), спирты, масла, желатины, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидин и красители и т.п. Такие препараты могут быть стерилизованными и, если необходимо, смешаны со вспомогательными агентами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, увлажняющие агенты, эмульгаторы, соли влияющие на осмотическое давление, буферы, красители и/или ароматические вещества и аналогичные, которые пагубно не реагируют с соединениями согласно изобретению. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что другие фармацевтические эксципиенты являются полезными в изобретении.

Термин "препарат" предназначен, чтобы включать композицию активного соединения с инкапсулирующим материалом как носителем, обеспечивающим капсулу, в которой активный компонент с или без других носителей, окружен носителем, который, таким образом, находится в соединении с ним. Аналогичным образом, саше и пастилки являются включенными. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, саше и пастилки могут быть использованы как твердые дозированные формы, приемлемые для перорально введения.

Как используется в данном документе, термин "введение" означает пероральное введение, введение в виде суппозитории, местный контакт, внутривенное, парентеральное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутриочаговое, интратекальное, интраназальное или подкожное введение, или имплантацию устройства замедленного высвобождения, например мини-осмотического насоса, субъекту. Введение является каким-либо путем, включая парентеральное и трансмукозальное (например, буккальное, сублингвальное, палатальное, десенное, назальное, вагинальное, ректальное или трансдермальное). Парентеральное введение включает, например, внутривенное, внутримышечное, внутриартериоальное, внутрикожное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрижелудочковое и внутричерепное. Другие способы доставки включают, но не ограничиваются этим, использование липосомальных препаратов, внутривенной инфузии, трансдермальных пластырей и т.д.

Композиции, раскрытые в данном документе, могут доставляться трансдермально, местным путем, сформулированные в виде аппликаторов-палочек, растворов, суспензий, эмульсий, гелей, кремов, мазей, паст, желе, лекарственных веществ в вязком носителе, порошков и аэрозолей. Пероральные препараты включают таблетки, пилюли, порошок, драже, капсулы, жидкости, пастилки, саше, гели, сиропы, взвеси, суспензии и т.д., приемлемые для приема внутрь пациентом. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, саше, суппозитории и диспергируемые гранулы. Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, водные растворы или растворы вода/пропиленгликоль. Композиции настоящего изобретения, кроме того, могут включать компоненты, чтобы обеспечить замедленное высвобождение и/или поддержку. Такие компоненты включают высокомолекулярные, анионные мукомиметические полимеры, желирующие полисахариды и мелкодисперсные субстраты носителя лекарственного средства. Данные компоненты обсуждаются более подробно в патентах США № 4911920; 5403841; 5212162; и 4861760. Полное содержания этих патентов включено в данный документ в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей. Композиции, раскрытые в данном документе, также могут быть доставлены в виде микросфер для медленного высвобождения в организме. Например, микросферы могут вводить путем внутрикожных инъекций микросфер, содержащих лекарственное средство, которые медленно высвобождаются подкожно (см. Rao, J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645, 1995; в виде биоразлагаемых и инъекционных гелевых препаратов (см., например, Gao Pharm. Res. 12:857-863, 1995); или, в виде микросфер для перорально введения (см., например, Eyles, J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674, 1997). В другом варианте реализации изобретения, препараты композиций согласно настоящему изобретению могут быть доставлены путем использования липосом, которые сливаются с клеточной мембраной или являются эндоцитозированными, т.е. путем использования рецепторных лигандов, присоединенных к липосоме, которые связываются с поверхностными мембранными белковыми рецепторами клетки, что в результате приводит к эндоцитозу. Путем использования липосом, в частности, когда липосомная поверхность несет рецепторные лиганды, специфические для клеток-мишеней, или иным образом преимущественно направлены на конкретный орган, липосомы могут фокусировать доставку композиций согласно настоящему изобретению в клетки-мишени in vivo. (см., например, Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13:293-306, 1996; Chonn, Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587, 1989). Композиции также могут быть доставлены в виде наночастиц.

Фармацевтические композиции могут включать композиции, в которых активный ингредиент (например, соединения, описанные в данном документе, включая варианты реализации изобретения или

примеры) содержится в терапевтически эффективном количестве, т.е. в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. Фактическое количество, эффективное для конкретного применения, будет зависеть, в том числе, от состояния, подлежащего лечению. При введении в способах лечения заболевания такие композиции будут содержать количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого результата, например, модулирования активности молекулы-мишени, и/или уменьшения, устранения или замедления прогрессирования симптомов заболевания.

Дозировка и частота (одна или нескольких доз), вводимая млекопитающему, может варьировать в зависимости от множества факторов, например страдает ли млекопитающее от другого заболевания, и от его пути введения; размера, возраста, пола, состояния здоровья, массы тела, индекса массы тела и диеты реципиента; природы и степени выраженности симптомов заболевания, подлежащего лечению, вида сопутствующего лечения, осложнений от заболевания, подлежащего лечению или других проблем, связанных со здоровьем. Другие терапевтические схемы лечения или агенты могут быть использованы в сочетании со способами и соединениями, заявляемыми изобретением. Регулирование и манипуляция установленных дозировок (например, частота и продолжительность) вполне находятся в пределах способности квалифицированного специалиста в данной области.

Соединения, описанные в данном документе, могут быть использованы в комбинации друг с другом, с другими активными лекарственными средствами, которые, как известно, являются полезными в лечении заболевания (например, противораковые лекарственные средства) или со вспомогательными агентами, которые не могут быть эффективными сами по себе, но могут вносить вклад в эффективность активного агента. Таким образом, соединения, описанные в данном документе, могут вводиться совместно друг с другом или с другими активными лекарственными средствами, которые, как известно, являются полезными в лечении заболевания.

Под термином "совместное введение" подразумевается, что соединение, описанное в данном описании, вводят в то же время, как раз перед или сразу после введения одного или более дополнительных средств терапий, например противоракового агента, которые описаны в данном документе. Соединения, описанные в данном документе, могут быть введены сами по себе или могут быть совместно введены пациенту. Совместное введение означает включение одновременного или последовательного введения соединения индивидуально или в комбинации (более одного соединения или агента). Таким образом, препараты также могут быть объединены, если это желательно, с другими активными веществами (например, противораковыми агентами).

Совместное введение включает введение одного активного агента (например, комплекса, описанного в данном документе) в пределах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 или 24 ч второго активного агента (например, противораковых агентов). Кроме того, рассматриваемыми в данном документе являются варианты реализации изобретения, в которых совместное введение включает введение одного активного агента в пределах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 или 24 ч второго активного агента. Совместное введение включает введение двух активных агентов одновременно, приблизительно одновременно (например, в пределах приблизительно 1, 5, 10, 15, 20 или 30 мин друг от друга), или последовательно в каком-либо порядке. Совместное введение может быть достигнуто путем совместной формуляции, т.е. приготовления одной фармацевтической композиции, включая оба активных агентов. В других вариантах реализации изобретения активные агенты могут быть сформулированы отдельно. Активные и/или вспомогательные агенты могут быть связаны или конъюгированы друг с другом. Соединения, описанные в данном документе, могут быть скомбинированы для лечения рака, такого как химиотерапия или лучевая терапия.

Термин "связанный" или "связанный с" в контексте вещества или активности или функции вещества, связанных с заболеванием, означает, что заболевание вызывается (полностью или частично), симптом заболевания вызывается (полностью или частично) веществом или активностью или функцией вещества, или побочный эффект соединения (например, токсичность) вызывается (полностью или частично) веществом или активностью или функцией вещества.

"Пациент", "субъект", "пациент, который в этом нуждается", и "субъект, который в этом нуждается" в документе используются взаимозаменяемо и касается живого организма, страдающего от или склонного к заболеванию или состоянию, которое могут лечить введением фармацевтической композиции, как представлено в данном документе. Не ограничивающие примеры включают людей, других млекопитающих, жвачных животных, крыс, мышей, собак, обезьян, коз, овец, коров, оленей и других животных, не относящихся к млекопитающим. В некоторых вариантах реализации изобретения пациент является человеком. "Раковый пациент" является пациентом, страдающим от или склонным к развитию рака.

"Заболевание" или "состояние" касается состояния существования или состояния здоровья пациента или субъекта, которое способно подвергаться лечению соединениями или способами, представленными в данном документе. Заболевание, как используется в данном документе, может относиться к раку.

Как используется в данном документе, термин "рак" касается всех типов рака, новообразований или злокачественных или доброкачественных опухолей, обнаруженных у млекопитающих, включая лейкоз, карциномы и саркомы. Типичные виды рака включают острый миелоидный лейкоз ("AML"), хронический миелобластный лейкоз ("CML") и рак головного мозга, молочной железы, поджелудочной железы, толстой кишки, печени, почек, легких, немелкоклеточный рак легких, меланому, рак яичников, саркому

и рак предстательной железы. Дополнительные примеры включают виды рака шейки матки, виды рака желудка, виды рака головы и шеи, виды рака матки, мезотелиому, метастатический рак кости, медуллобластому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, рак яичников, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, первичные опухоли головного мозга, рак, злокачественную поджелудочную инсулиному, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, пред-злокачественные поражения кожи, тестикулярный рак, лимфомы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак пищевода, рак мочеполового тракта, злокачественную гиперкальциемию, рак эндометрия, рак коры надпочечников и новообразования эндокринной и экзокринной поджелудочной железы.

Термин "лейкоз" широко относится к прогрессивным, злокачественным заболеваниям кроветворных органов и, как правило, характеризуется искаженной пролиферацией и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. Лейкоз, как правило, клинически классифицируют на основании (1) длительности и характера заболевания - острый или хронический; (2) типа участвующих клеток; миелоидный (миелогенный), лимфоидный (лимфогенный), или моноцитарный; и (3) увеличение или не увеличение числа аномальных клеток в крови - лейкозный или алейкозный (сублейкозный). Мышиная модель лейкоза широко признается как такая, что предвещает in vivo антилейкозную активность. Полагают, что соединение, которое дает положительный результат теста в анализе P388 клеток, как правило, будут демонстрировать некоторый уровень антилейкозной активности, независимо от типа лейкоза, подвергаемого лечению. Соответственно, настоящее изобретение включает способ лечения лейкоза, включая лечение острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого гранулоцитарного лейкоза, хронический гранулоцитарного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, лейкоз взрослых Т-клеток, алейкозного лейкоза, лейкоцитемичного лейкоза, базофильного лейкоза, недифференцируемого лейкоза, бычьего лейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, поражения кожи при лейкозе, эмбрионального лейкоза, эозинофильного лейкоза, лейкоза Гросса, волосато-клеточного лейкоза, гемобластного лейкоза, гемоцитобластного лейкоза, гистиоцитарного лейкоза, лейкоза стволовых клеток, острого моноцитарного лейкоза, лейкопенического лейкоза, лимфатического лейкоза, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лимфогенного лейкоза, лимфоидного лейкоза, лимфосаркомоклеточного лейкоза, тучноклеточного лейкоза, мегакариоцитарного лейкоза, микромиелобластного лейкоза, моноцитарного лейкоза, миелобластного лейкоза, миелоцитарного лейкоза, миелоидного гранулоцитарного лейкоза, миеломоноцитарного лейкоза, лейкоза Нейджели, плазмаклеточного лейкоза, множественной миеломы, плазмацитарного лейкоза, промиелоцитарный лейкоза, лейкоза клеток Ридера, лейкоза Шиллинга, лейкоза стволовых клеток, сублейкозного лейкоз и недифференцированного клеточного лейкоза.

Термин "саркома" обычно относится к опухоли, которая состоит из вещества подобного эмбриональной соединительной ткани и обычно состоит из плотно упакованных клеток, погруженных в фибриллярное или гомогенное вещество. Саркомы, которые можно лечить с использованием комбинации противоопухолевого тиол-связывающего митохондриального окислителя и противоракового агента, включают хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркому Абемети, инфильтрирующую липому, липосаркому, саркому альвеолярной мягкой части, амелобластную саркому, ботриоидную саркому, хлорлейкозную саркому, хорио карциному, эмбриональную саркому, опухолевую саркому Вильмса, эндометриальную саркому, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркома, фибробластную саркому, гигантоклеточную саркому, гранулоцитарную саркому, саркому Ходжкина, идиопатическую множественную пигментированную геморрагическую саркому, иммунобластную саркому В-клеток, лимфому, иммунобластную саркому Т-клеток, саркому Дженсена, саркому Капоши, саркому купферовских клеток, ангиосаркому, лейкосаркому, злокачественную мезенхимальную саркому, паростальную саркому, ретикулоцитарную саркому, саркому Рауса, серо-цистосаркому, синовиальную саркому и телеангиэктатическую саркому.

Термин "меланома" берется для обозначения опухоли, возникающей из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы, которые можно лечить с использованием комбинации противоопухолевого тиол-связывающего митохондриального окислителя и противоракового агента, включают, например, акральную лентигинозную меланому, беспигментную меланому, доброкачественную ювенильную меланому, меланому Клаудмана, S91 меланому, меланому Гардинг-Пасси, ювенильную меланому, лентиго злокачественную меланому, злокачественную меланому, узловую меланому, подногтевую меланому и поверхностную распространяющуюся меланому.

Термин "карцинома" касается злокачественного нового роста, состоящего из эпителиальных клеток, имеющих тенденцию проникать в окружающие ткани и вызывать метастазы. Типичные виды карциномы, которые можно лечить с использованием комбинации противоопухолевого тиол-связывающего митохондриального окислителя и противоракового агента, включают, например, железистую карциному, аденокарциному, аденокистозную карциному, железисто-кистозную карциному, аденомотозную карциному, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярную клеточную карциному, базально-клеточную карциному, базоцеллюлярную карциному, базалоидную карциному, базальную плоскоклеточную карциному, бронхиоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную

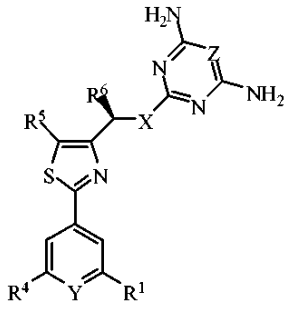
карциному, медуллярную карциному, холангиоцеллюлярную карциному, хорионическую карциному, коллоидную карциному, комедокарциному, карциному свода, решетчатовидную карциному, карциному плевры, карциному кожи, цилиндрическую карциному, цилиндрическую клеточную карциному, дуктальную карциному, карциному дурум, эмбриональную карциному, круглоклеточную карциному, эпидермоидную карциному, карциному эпителиальных аденоидов, экзофитную карциному, карциному из язвы, фиброзную карциному, желеобразную карциному, коллоидную карциному, гигантоклеточную карциному, гигантоцеллюларную карциному, железистую карциному, гранулезоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, гематоидную карциному, гепатоцеллюлярную карциному, карциному из клеток Гюртля, гиалиновую карциному, гипернефроидную карциному, начальную эмбриональную карциному, карциному in situ, внутриэпидермальную карциному, внутриэпителиальную карциному, карцинома Кромпечера, карциному клеток Кульчицкого, большую клеточную карциному, хрусталиковую карциному, карциному хрусталика, липоматозную карциному, лимфоэпителиальную карциному, карциному костного мозга, медуллярную карциному, меланотическую карциному, карциному Молле, слизеобразующую карциному, муциновую карциному, мукоцеллюлярную карциному, мукоэпидермоидную карциному, карциному слизистой оболочки, мукозную карциному, карциному миксоматод, назофарингальную карциному, овсяноклеточную карциному, оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, шиловидноклеточную карциному, слизеобразующую карциному, почечно-клеточную карциному почки, резервоклеточную карциному, карциному саркоматодов, карциному Шнайдера, скиррозную карциному, карциному скроти, перстневидноклеточную карциному, недифференцированную карциному, мелкоклеточную карциному, соленоидную карциному, сфероидноклеточную карциному, веретеноклеточную карциному, губчатую карциному, сквамозную карциному, плоскоклеточную карциному, струнную карциному, телеангиэктатическую карциному, карциному из гладких мышечных волокон и сосудистой ткани, переходно-клеточную карциному, шишковидную карциному, туберозную карциному, бородавчатую карциному и ворсистую карциному.

"Химиотерапевтический" или "химиотерапевтический агент" используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается химической композиции или соединения, имеющего противоопухолевые свойства или способность ингибировать рост или пролиферацию клеток.

"Организм модели рака", как используется в данном документе, представляет собой организм, демонстрирующий фенотип, свойственный раку, или активность вызывающих рак элементов, внутри организма. Термин "рак" определяется выше. Широкое разнообразие организмов может служить в качестве организмов модели рака и включают, например, раковые клетки и организмы млекопитающих, таких как грызуны (например, мышь или крыса) и приматы (такие как, люди). Линии раковых клеток широко понимаются квалифицированным специалистом в данной области как клетки, демонстрирующие фенотипы или генотипы, аналогичные in vivo видам рака. Линии раковых клеток, как используется в данном документе, включает клеточные линии от животных (например, мышей) и от людей.

I. Композиции.

В настоящем документе представлены соединения, имеющие формулу



(IA),

где Y представляет собой $C(R^8)$;

Z представляет собой $C(R^9)$ или N;

X представляет собой CH_2, O, $N(R^{10})$, S или S(O);

R^1 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{1A}$, $-OR^{1A}$, $-NR^{1A}R^{1B}$, $-C(O)OR^{1A}$, $-C(O)NR^{1A}R^{1B}$, $-NO_2$, $-SR^{1A}$, $-S(O)_{n1}R^{1A}$, $-S(O)_{n1}OR^{1A}$, $-S(O)_{n1}NR^{1A}R^{1B}$, $-NHNR^{1A}R^{1B}$, $-ONR^{1A}R^{1B}$, $-NHC(O)NHNR^{1A}R^{1B}$, замещенный R^{1A} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{1A} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный фенил или замещенный R^{1A} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{1A} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, $-OR^{12}$, $-N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-COOR^{12}$, $-CON(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NO_2$, $-S(R^{12})$, $-S(O)_2R^{12}$, $-S(O)_3R^{12}$, $-S(O)_4R^{12}$, $-S(O)_2N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHN(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-ON(R^{12,1)}(R^{12,2})$, $-NHC(O)NHN(R^{12,1)}(R^{12,2})$, $-NHC(O)N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHS(O)_2R^{12}$, $-NHC(O)R^{12}$, $-NHC(O)OR^{12}$, $-NHOR^{12}$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{11} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{11} или незаме-

щенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{11} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{11} или незамещенный фенил или замещенный R^{11} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{11} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{12} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{12} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{12} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{12} или незамещенный фенил или замещенный R^{12} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{12}, $R^{12,1}$ и $R^{12,2}$ независимо представляют собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенный C_1-C_6-алкил, незамещенный 2-6-членный гетероалкил, незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, незамещенный фенил или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^4 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-Cl_3$, -CN, $-COR^{4A}$, $-OR^{4A}$, $-NR^{4A}R^{4B}$, $-C(O)OR^{4A}$, $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$, $-NO_2$, $-SR^{4A}$, $-S(O)_{n4}R^{4A}$, $-S(O)_{n4}OR^{4A}$, $-S(O)_{n4}NR^{4A}R^{4B}$, $-NHNR^{4A}R^{4B}$, $-ONR^{4A}R^{4B}$, $-NHC(O)NHNR^{4A}R^{4B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил, или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^5 независимо представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{5A}$, $-OR^{5A}$, $-NR^{5A}R^{5B}$, $-C(O)OR^{5A}$, $-C(O)NR^{5A}R^{5B}$, $-NO_2$, $-SR^{5A}$, $-S(O)_{n5}R^{5A}$, $-S(O)_{n5}OR^{5A}$, $-S(O)_{n5}NR^{5A}R^{5B}$, $-NHNR^{5A}R^{5B}$, $-ONR^{5A}R^{5B}$, $-NHC(O)NHNR^{5A}R^{5B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил, где R^5 и R^6 необязательно объединяются с образованием замещенного или незамещенного C_3-C_6-циклоалкила; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^6 представляет собой незамещенный C_1-C_6-алкил;

R^8 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{8A}$, $-OR^{8A}$, $-NR^{8A}R^{8B}$, $-C(O)OR^{8A}$, $-C(O)NR^{8A}R^{8B}$, $-NO_2$, $-SR^{8A}$, $-S(O)_{n8}R^{8A}$, $-S(O)_{n8}OR^{8A}$, $-S(O)_{n8}NR^{8A}R^{8B}$, $-NHNR^{8A}R^{8B}$, $-ONR^{8A}R^{8B}$, $-NHC(O)NHNR^{8A}R^{8B}$, замещенный R^{8A} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{8A} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный фенил, или замещенный R^{8A} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{8A} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, $-OR^{15}$, $-N(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-COOR^{15}$, $-CON(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NO_2$, $-SR^{15}$, $-S(O)_2R^{15}$, $-S(O)_3R^{15}$, $-S(O)_4R^{15}$, $-S(O)_2N(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHN(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-ON(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHC(O)NHN(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHC(O)N(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHS(O)_2R^{15}$, $-NHC(O)R^{15}$, $-NHC(O)OR^{15}$, $-NHOR^{15}$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{15} или незамещенный алкил, замещенный R^{15} или незамещенный гетероалкил, замещенный R^{15} или незамещенный циклоалкил, замещенный R^{15} или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный R^{15} или незамещенный арил или замещенный R^{15} или незамещенный гетероарил;

R^{15}, $R^{15,1}$ и $R^{15,2}$ независимо представляют собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{16} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{16} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{16} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{16} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{16} или незамещенный фенил или замещенный R^{16} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{16} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенный C_1-C_6-алкил, незамещенный 2-6-членный гетероалкил, незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, незамещенный фенил или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^9 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-Cl_3$, -CN, $-COR^{9A}$, $-OR^{9A}$, $-NR^{9A}R^{9B}$, $-C(O)OR^{9A}$, $-C(O)NR^{9A}R^{9B}$, $-NO_2$, $-SR^{9A}$, $-S(O)_{n9}R^{9A}$, $-S(O)_{n9}OR^{9A}$, $-S(O)_{n9}NR^{9A}R^{9B}$, $-NHNR^{9B}R^{8B}$, $-ONR^{9A}R^{9B}$, $-NHC(O)NHNR^{9A}R^{9B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещен-

ный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил, или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил, и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^{10} представляет собой H, $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$, $-CH_2C_6H_5$;

R^{1A}, R^{1B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{8A}, R^{8B}, R^{9A} и R^{9B} независимо представляют собой водород, оксо, галоген, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил, или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил, и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

n1, n4, n5, n8 и n9 независимо представляют собой 1, 2 или 3; и

где гетероалкил, гетероциклил и гетероарил содержат по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S; и

где заместитель у R^4, R^5, R^9, R^{1A}, R^{1B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{8A}, R^{8B}, R^{9A} и R^{9B} выбирают из:

(A) оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(B) C_1-C_6-алкила, гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(i) оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(ii) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

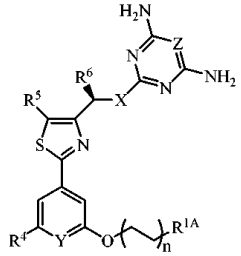
(a) оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила, и

(b) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила.

В соединении формулы (IA) R^4 может представлять собой водород. В соединении формулы (IA) каждый из R^5 и R^6 представляет собой незамещенный C_1-C_6-алкил. В соединении формулы (IA) R^1 может представлять собой водород, галоген, $-OR^{1A}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил. В соединении формулы (IA) R^1 может представлять собой $-OR^{1A}$, и R^{1A} может представлять собой замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, или замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил. В соединении формулы (IA) R^{1A} может представлять собой $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$, $-CD_3$, $-CD_2CD_3$, $-(CH_2)_2OH$, $-(CH_2)_3OH$, $-CH_2CH(OH)CH_3$, $-(CH_2)_2CH(OH)CH_3$, $-CH_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2F$, $-(CH_2)_3F$, $-CH_2CH(F)CH_3$, $-(CH_2)_2CH(F)CH_3$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2F$, $-(CH_2)_2Cl$, $-(CH_2)_3Cl$, $-CH_2CH(Cl)CH_3$, $-(CH_2)_2CH(Cl)CH_3$, $-CH_2C(CH_3)_2Cl$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2Cl$, $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$, $-(CH_2)_3NHSO_2CH_3$, $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$, $(CH_2)_3N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$, $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$ или $(CH_2)_2N(CH_2CH_2Cl)SO_2CH_3$. В соединении формулы (IA) R^8 может представлять собой водород, галоген, $-OR^{8A}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил. В соединении формулы (IA) R^8 может представлять собой $-OR^{8A}$, и R^{8A} при этом представляет собой водород, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, в частности $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-CD_3$, $-CD_2CD_3$, $-(CH_2)_2OH$, $-(CH_2CH_2)_3OH$,

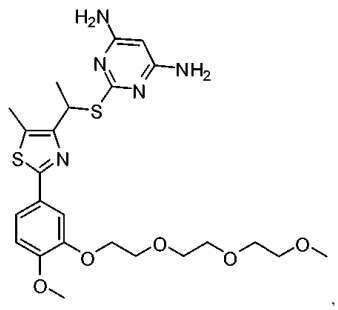
$-CH_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2F$, $-(CH_2)_3F$, $-CH_2C(CH_3)_2F$ или $-(CH_2)_2C(CH_3)_2F$, или замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил. В соединении формулы (IA) Z может представлять собой CH. В соединении формулы (IA) X может представлять собой S.

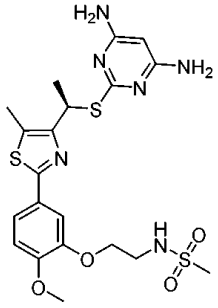
Соединение формулы (1A) может иметь формулу



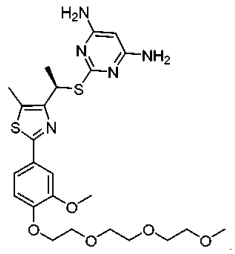
где все радикалы такие, как указано в настоящем документе.

Соединение формулы (1A) может иметь формулу





или



II. Фармацевтические композиции.

Кроме того, в настоящем документе представлены фармацевтические препараты. В одном аспекте фармацевтическая композиция является такой, что включает соединение, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

1) Препараты.

Фармацевтическая композиция может быть получена и введена в самые разнообразные дозированные препараты. Описанные соединения могут вводиться перорально, ректально или инъекционно (например, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутридуоденально или внутрибрюшинно).

Для получения фармацевтических композиций из соединений, описанных в данном документе, фармацевтически приемлемые носители могут быть либо твердыми, либо жидкими. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, саше, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или больше вещество, которое может также действовать как разбавители, ароматизаторы, связующие вещества, консерванты, дезинтегрирующие таблетки агенты или инкапсулирующий материал.

В порошках носитель может представлять собой тонко измельченное твердое вещество в смеси с тонко измельченным активным компонентом. В таблетках активный компонент может быть смешан с носителем, обладающим необходимыми связующими свойствами, в приемлемых количественных соотношениях и спрессован в желаемую форму и желаемого размера.

Порошки и таблетки предпочтительно содержат от 5 до 70% активного соединения. Приемлемыми носителями являются карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактоза, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, легкоплавкий воск, масло какао и тому подобное. Термин "препарат" предназначен, чтобы включать активное соединение с инкапсулирующим материалом как носителем, обеспечивающим капсулу, в которой активный компонент с или без других носителей окружен носителем, который, таким образом, находится в сочетании с ним. Аналогичным образом, включеными являются саше и пастилки. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, саше и пастилки могут быть использованы в качестве твердых дозированных форм, приемлемых для перорального введения.

Для получения суппозитории легкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот или масло какао, сначала расплавляют, и в нем с перемешиванием гомогенно диспергируют активные компонент. Расплавленную гомогенную смесь затем выливают в формы подходящего размера, дают остыть и, тем самым, затвердеть.

Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например водные растворы или растворы вода/пропиленгликоль. Для парентерального введения жидкие препараты могут быть сформулированы в виде раствора в водный раствор полиэтиленгликоля.

Водные растворы, приемлемые для перорального применения, могут быть получены путем растворения активного компонента в воде и добавления приемлемых красителей, ароматизаторов, стабилизаторов и загустителей по желанию. Водные суспензии, приемлемые для перорального применения, могут быть приготовлены путем диспергирования тонко измельченного активного компонента в воде с вязким материалом, таким как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и другие хорошо известные суспендирующие агенты.

Кроме того, включенными являются препараты в твердой форме, которые предназначены для превращения, незадолго до использования, в препараты в жидкой форме для перорально введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Данные препараты могут содержать в дополнение к активному компоненту красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизирующие агенты и тому подобное.

Фармацевтический препарат предпочтительно находится в единичной дозированной форме. В такой форме препарат подразделяется на единичные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Единичная дозированная форма может представлять собой упакованный препарат, причем упаковка содержит дискретные количества препарата, такие как упакованные таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Кроме того, единичная дозированная форма может представлять собой собственно капсулу, таблетку, саше или пастилку, или она может представлять собой соответствующее количество какой-либо из данных в упакованной форме.

Количество активного компонента в единичном дозированном препарате может варьировать или регулироваться от 0,1 до 10000 мг в зависимости от конкретного применения и эффективности активного компонента. Композиция может, если необходимо, также содержать другие совместимые терапевтические агенты.

Некоторые соединения могут иметь ограниченную растворимость в воде и, следовательно, могут потребовать поверхностно-активное вещество или другой соответствующий сорастворитель в композиции. Такие сорастворители включают полисорбат 20, 60 и 80; плюроник F-68, F-84 и P-103; циклодекстрин; и полиоксил 35 касторовое масло. Такие сорастворители, как правило, применяют в количестве от примерно 0,01% до примерно 2 мас.%. Более высокая вязкость, чем у простых водных растворов, может быть желательной, чтобы уменьшить вариабельность дозирования препаратов, чтобы уменьшить физическое разделение компонентов суспензии или эмульсии препарата, и/или иным образом улучшить препарат. Такие формирующие вязкость агенты включают, например, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, сульфат хондроитина и их соли, гиалуроновую кислоту и ее соли и комбинации указанных выше. Такие агенты, как правило, применяют в количестве от примерно 0,01% до примерно 2 мас.%.

Фармацевтические композиции могут дополнительно включать компоненты, чтобы обеспечить замедленное высвобождение и/или содействие. Такие компоненты включают высокомолекулярные, анионные полимеры-мукомиметики, желирующие полисахариды и мелкодисперсные субстраты носителя лекарственного средства. Данные компоненты обсуждаются более подробно в патентах США № 4911920; 5403841; 5212162 и 4861760. Полные содержания данных патентов включены в данном документе в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей.

Фармацевтическая композиция может быть предназначена для внутривенного применения. Фармацевтически приемлемый эксципиент может включать буферы для регулирования pH до требуемого диапазона для внутривенного применения. Многие буферы, включая соли неорганических кислот, такие как фосфат, борат и сульфат, известны.

2) Эффективные дозировки.

Фармацевтическая композиция включает композиции, в которых активный ингредиент содержится в терапевтически эффективном количестве, т.е. в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. Фактическое количество, эффективное для конкретного применения, будет зависеть, в том числе, от состояния, подлежащего лечению.

Дозировка и частота (одна или нескольких доз) вводимых соединений может варьировать в зависимости от целого ряда факторов, включая путь введения; размер, возраст, пол, состояние здоровья, массу тела, индекс массы тела и диету реципиента; характер и степень выраженности симптомов заболевания, подлежащего лечению; наличие других заболеваний или других проблем, связанных со здоровьем; вид сопутствующего лечения; и осложнения от какого-либо заболевания или схемы лечения. Другие терапевтические схемы лечения или агенты могут быть использованы в сочетании со способами и соедине-

ниями, раскрытыми в данном документе.

Для соединений, описанных в данном документе, терапевтически эффективные количества первоначально могут быть определены из анализов клеточных культур. Целевые концентрации будут такими концентрациями активного(ых) соединения(й), которые способны повысить степень смерти раковых клеток, как измерено, например, используя способы, известные в данной области.

Терапевтически эффективные количества для использования у людей могут быть определены из моделей на животных. Например, доза для людей может быть сформулирована для достижения концентрации, которая, как обнаружено, является эффективной у животных. Дозировку для людей могут регулировать путем мониторинга ответа рака на лечение и регулировать дозировку повышением или понижением, как описано выше.

Дозировки могут варьировать в зависимости от потребностей субъекта и используемого соединения. Доза, вводимая субъекту, в контексте фармацевтических композиций, представленных в данном документе, должна быть достаточной для реализации изобретения благоприятного терапевтического ответа у субъекта с течением времени. Размер дозы также будет определяться существованием, природой и степенью каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Как правило, лечение начинают с более низких дозировок, которые меньше, чем оптимальная доза соединения. Впоследствии дозу увеличивают небольшими шагами, пока при данных обстоятельствах не достигается оптимального эффекта.

Количества и интервалы дозирования могут регулироваться индивидуально, чтобы обеспечить уровни вводимых соединений, эффективные для конкретного клинического показания подвергаемого лечению. Это обеспечит схему терапевтического лечения, которая соответствует тяжести болезненного состояния индивидуума.

Используя принципы, представленные в данном документе, эффективная профилактическая или терапевтическая схема лечения может быть спланирована так, что не вызывает существенной токсичности и еще является вполне эффективной для лечения клинических симптомов, продемонстрированных конкретным пациентом. Это планирование должно включать тщательный выбор активного соединения, принимая во внимание факторы, такие как эффективность соединения, относительная биодоступность, масса тела пациента, наличие и тяжесть нежелательных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного агента.

3) Токсичность.

Соотношение между токсичностью и терапевтическим эффектом для конкретного соединения является его терапевтическим индексом и может быть выражен как отношение между LD_{50} (количеством соединения, летальным в 50% популяции) и ED_{50} (количеством соединения, эффективным в 50% популяции). Соединения, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. Данные терапевтического индекса, полученные из анализов на культурах клеток и/или исследований на животных, могут быть использованы при формулировании диапазона дозировок для использования у людей. Дозировка таких соединений предпочтительно лежит в диапазоне концентраций в плазме, которые включают ED_{50} с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой дозированной формы и используемого способа введения, см., например, Fingl et al., в: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch, 1, p.1, 1975. Точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны индивидуальным лечащим врачом с учетом состояния пациента и конкретного способа, в котором используют соединение.

Когда необходимо или желательно парентеральное применение, в частности приемлемые смеси для соединений, включенных в фармацевтическую композицию, могут представлять собой инъекционные стерильные растворы, масляные или водные растворы, а также суспензии, эмульсии или имплантаты, включая суппозитории. В частности, носители для парентерального введения включают водные растворы декстрозы, чистую воду, этанол, глицерин, пропиленгликоль, арахисовое масло, кунжутное масло, полиоксиэтилен-блок-полимеры и тому подобное. Ампулы являются общепринятыми единичными дозированиями. Фармацевтические смеси, приемлемые для использования в фармацевтических композициях, представленных в данном документе, могут включать те, которые описаны, например, в Pharmaceutical Sciences (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) и WO 96/05309, принципы обоих из которых являются включенными в данный документ в качестве ссылки.

III. Способы лечения.

Кроме того, в настоящем документе представлены способы лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, путем введения субъекту эффективного количества соединения, описанного в данном документе, где указанный рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

Рак может представлять собой лейкоз или лимфому. Рак может представлять собой лейкоз. Рак может представлять собой острый лимфобластный лейкоз (ALL). Рак может представлять собой лимфому. Рак может представлять собой солидный опухолевый рак. Солидный опухолевый рак может характеризоваться высоким уровнем репликационного стресса, как определено путем измерения экспрессии гамма H2A.X. Рак может представлять собой рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легкого, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак предстательной железы или рак головы и шеи. Рак может представлять собой рак яичников. Рак

может представлять собой рак поджелудочной железы. Рак может представлять собой рак легкого. Рак может представлять собой глиобластому. Рак может представлять собой гепатоцеллюлярную карциному. Рак может представлять собой рак молочной железы. Рак может представлять собой тройной негативный рак молочной железы. Рак может представлять собой рак предстательной железы. Рак может представлять собой рак головы и шеи.

IV. Другие аспекты.

Представленными в данном документе, в другом аспекте, являются композиции и способы лечения заболевания. Следующие определения и варианты реализации изобретения применяют только к соединениям формулы (pI), данному разделу (т.е. разделу V) и вариантам реализации изобретения P1-P25, перечисленным ниже.

Для целей данного раздела термин "алкил" касается и включает линейные или разветвленные одновалентные углеводородные структуры и их комбинацию, который может быть полностью насыщенным, моно- или полиненасыщенным, имеющий определенное количество атомов углерода (т.е. C_1-C_{10}- означает от одного до десяти углеродов). Конкретные алкильные группы являются такими, которые имеют от 1 до 20 атомов углерода ("C_1-C_{20}-алкил"). Более конкретные алкильные группы являются такими, которые имеют от 1 до 8 атомов углерода ("C_1-C_8-алкил"), 3-8 атомов углерода ("C_3-C_8-алкил"), от 1 до 6 атомов углерода ("C_1-C_6-алкил"), от 1 до 5 атомов углерода ("C_1-C_5-алкил"), или от 1 до 4 атомов углерода ("C_1-C_4-алкил"). Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают, но не ограничиваются этим, группы, такие как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, вторбутил, гомологи и изомеры, например н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил, и аналогичные. Ненасыщенная алкил группа представляет собой группу, которая имеет одну или больше двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются этим, винил, 2-пропенил, кротоновую группу, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил, и высшие гомологи и изомеры. Примеры насыщенного C_1-C_4-алкила включают метил (CH_3), этил (C_2H_5), пропил (C_3H_7) и бутил (C_4H_9). Примеры насыщенного C_1-C_6-алкила включают метил (CH_3), этил (C_2H_5), пропил (C_3H_7), бутил (C_4H_9), пентил (C_5H_{11}) и гексил (C_6H_{13}).

Алкильная группа может представлять собой замещенный (т.е. один или больше атомов водород замещены на одновалентные или двухвалентный радикалы) одним или больше заместителями, такими как радикалы, описанные в данном документе, например, фтор, хлор, бром, йод, гидроксил, алкокси, тио, амино, ациламино, алкоксикарбониламидо, карбоксил, ацил, алкоксикарбонил, сульфонил, циклоалкил, арил, гетероциклил и гетероарил и другие функциональные группы, известные в данной области. "Перфторалкил" касается алкильной группы, где каждый атом водорода замещается на атом фтора. Примеры насыщенного C_1-C_6-перфторалкила включают трифторметил (CF_3), пентафторэтил (C_2F_5), гептафторпропил (C_3F_7), нонафторбутил (C_4F_9), ундекафторпентил (C_5F_{11}) и тридекафторгексил (C_6F_{13}).

Для целей данного раздела термин "циклоалкил" касается и включает циклические одновалентные углеводородные структуры, которые могут быть полностью насыщенными, моно- или полиненасыщенными, имеющими определенное количество атомов углерода (т.е. C_1-C_{10} означает от одного до десяти углеродов). Циклоалкил может состоять из одного кольца, такой как циклогексил, или нескольких колец, такой как адамантил, но исключает арильные группы. Циклоалкил, содержащий больше, чем одно кольцо, может быть анелированным, спиро или мостиковым или их комбинациями. Предпочтительный циклоалкил представляет собой циклический углеводород, имеющий от 3 до 13 кольцевых атомов углерода. Более предпочтительный циклоалкил представляет собой циклический углеводород, имеющий от 3 до 8 кольцевых атомов углерода ("C_3-C_8-циклоалкил"). Примеры циклоалкила включают, но не ограничиваются этим, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил, норборнил и аналогичные.

Для целей данного раздела термин "гетероцикл" или "гетероциклил" касается насыщенной или ненасыщенной неароматической группы, имеющей от 1 до 10 кольцевых атомов углерода и от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, таких как азот, сера или кислород, и аналогичные, где атомы азота и серы необязательно являются окисленными, и атом(ы) азота необязательно являются кватернизированным(ми). Гетероциклильная группа может иметь одно кольцо или несколько конденсированных колец, но исключает гетероарильные группы. Гетероцикл, содержащий больше, чем одно кольцо, может быть анелированным, спиро или мостиковым, или какой-либо их комбинацией. В анелированной кольцевой системе одно или больше анелированных колец могут представлять собой арил или гетероарил. Примеры гетероциклических групп включают, но не ограничиваются этим, тетрагидропиранил, дигидропиранил, пиперидинил, пиперазинил, пирролидинил, тиазолинил, тиазолидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофенил, 2,3-дигидробензо[b]тиофен-2-ил, 4-амино-2-оксопиримидин-1(2H)-ил, и тому подобные.

Для целей данного раздела термин "арил" касается и включает полиненасыщенные ароматические углеводородные заместители. Арил может содержать дополнительные анелированные кольца (например, от 1 до 3 колец), включая, кроме того, анелированные арильные, гетероарильные, циклоалкильные и/или гетероциклические кольца. В одном варианте арильная группа содержит от 6 до 14 кольцевых атомов углерода. Примеры арильных групп включают, но не ограничиваются этим, фенил, нафтил, бифенил и

аналогичные.

Для целей данного раздела термин "гетероарил" касается и включает ненасыщенных ароматических циклических групп, имеющих от 1 до 10 кольцевых атомов углерода и по меньшей мере один кольцевой гетероатом, включая, но не ограничиваясь этим, гетероатомы, такие как азот, кислород и сера, где атомы азота и серы необязательно являются окисленными, и атом(ы) азота необязательно являются кватернизированными. Гетероарильная группа может быть присоединенной к остатку молекулы кольцевым углеродом или кольцевым гетероатомом. Гетероарил может содержать дополнительные анелированные кольца (например, от 1 до 3 колец), включая, кроме того, анелированные арильные, гетероарильные, циклоалкильные и/или гетероциклические кольца. Примеры гетероарильных групп включают, но не ограничиваются этим, пиридил, пиримидил, тиофенил, фуранил, тиазолил и аналогичные.

Циклоалкильные, арильные, гетероциклические и гетероарильные группы, как об этом говорится в данном разделе, также могу быть замещенными одним или больше заместителями, такими как радикалы, подробно описанные в данном документе, например фтор, хлор, бром, йод, гидроксил, алкокси, тио, амино, ациламино, алкоксикарбониламидо, карбоксил, ацил, алкоксикарбонил, сульфонил, алкил, циклоалкил, арил, гетероциклил и гетероарил и другие функциональные группы, известные в данной области.

Для целей данного раздела термин "фармацевтически приемлемый носитель" касается ингредиента в фармацевтическом препарате, кроме активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается этим, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант, такой как те, что известны в данной области, например, описанный в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Как используется в данном разделе, "лечение" или "способ лечения" представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, включая и предпочтительно клинические результаты. Например, благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, один или больше из следующих: снижение симптомов, возникающий в результате заболевания, повышение качества жизни людей, страдающих от заболевания, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, замедление прогрессирования заболевания, и/или увеличение продолжительности жизни индивидуумов.

Как используется в данном разделе, фраза "замедление развития заболевания" означает отсрочку, препятствование, замедление, задержку, стабилизацию и/или откладывание развития заболевания (такого как рак). Данное замедление может быть различной продолжительности времени в зависимости от истории заболевания и/или индивидуального, подвергаемого лечению. Как очевидно для квалифицированного специалиста в данной области, достаточное или значительное замедление, в действительности, может включать предупреждение, в том смысле, что у индивидуума не развивается заболевание. Например, рак поздней стадии, такой как развитие метастаз, может быть отсрочен.

Как используется в данном разделе, "эффективная дозировка" или "эффективное количество" лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции означает количество достаточное для реализации изобретения полезных или желаемых результатов. Для профилактического применения благоприятные или желаемые результаты включают результаты, такие как устранение или снижение риска, уменьшение тяжести или отсрочка начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, присутствующие во время развития заболевания. Для терапевтического применения благотворные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как снижение одного или больше симптомов, возникающих в результате заболевания, повышение качества жизни людей, страдающих от заболевания, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другой лекарственного средства, например, путем направленного взаимодействия, замедление прогрессирования заболевания и/или увеличение продолжительности жизни. В случае рака или опухоли эффективное количество лекарственного средства может иметь эффект снижения количества раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирования (т.е. замедления до некоторой степени и предпочтительно остановки) проникновения раковых клеток в периферические органы; ингибирования (т.е. замедления до некоторой степени и предпочтительно остановки) метастазирования опухоли; ингибирования до некоторой степени роста опухоли; и/или облегчения до некоторой степени одного или более симптомов, связанных с расстройством. Эффективная дозировка может быть введена в один или несколько приемов. Для целей данного раздела эффективная дозировка лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции означает количество достаточное для достижения профилактического или терапевтического лечения или непосредственно, или опосредовано. Как очевидно в клиническом контексте, эффективная дозировка лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может или не может достигаться в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективная дозировка" может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и один агент может рассматриваться как такой, который дается в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими агентами может быть или достигается желаемый результат.

Если явно не указано иное, для целей данного раздела термин "индивидуум", как используется в

данном документе, касается млекопитающего, включая, но не ограничиваясь этим, крупный рогатый скот, лошадь, домашнюю кошку, кролика, собаку, грызунов или примата (например, человека). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум не является человекообразным приматом, таким как шимпанзе и другие виды обезьян и мартышек. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является сельскохозяйственным животным, таким как крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы и свиньи; домашними животными, такими как кролики, собаки и кошки; лабораторными животными, включая грызунов, таких как крысы, мыши и морские свинки; и тому подобное. Аспекты, описанные в данном разделе, могут найти применение как в медицине человека, так и в контексте ветеринарии.

Как используется в данном разделе и в прилагаемых вариантах реализации изобретения P1-P25, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное.

Понятно, что аспект и вариации аспектов, описанных в данном разделе, включают "состоящий" и/или "состоящий в основном из" аспектов и вариаций.

Способы лечения.

В другом аспекте данного раздела, соединения, представленные в данном документе, связываются с полипептидом дезоксицитидинкиназы и ингибируют ее активность. Таким образом, предусмотренными в данном разделе являются способы ингибирования активности dCK и лечения заболеваний и расстройств, где задействована активность dCK.

Эффективность dCK ингибиторных активностей соединений может быть исследована путем измерения поглощения клеточного субстрата и фосфорилирования, для примеров, поглощения [^{3}H]-дезоксицитидина (dCyd или dC) в CEM (человека) или L1210 (мыши) клетках. Соединения могут быть дополнительно проверены на низкую побочную токсичность (например, ингибирование роста и пролиферации dCK отрицательных клеток) и селективность по отношению к другим нуклеозидкиназам (например, тимидинкиназе).

В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, предусмотренным является способ ингибирования активности дезоксицитидинкиназы (dCK), включающий контактирование соединение, детально описанного в разделе V, (например, соединение формулы (pI)) с дезоксицитидинкиназой, или in vitro (например, в параметрах ферментного анализа или анализа на основе клеток) или in vivo (например, в моделях на животных или у индивидуального субъекта, нуждающегося в лечении).

Не желая быть связанными теорией, в вариантах реализации изобретения данного раздела, фармакологические подходы вызывают нуклеотидную недостаточность в высоко пролиферирующих опухолях для того, чтобы блокировать их пролиферацию путем их остановки в S-фазе клеточного цикла. Например, пулы дезоксицитидинтрифосфата (дЦТФ) истощаются тимидином в сочетании с ингибиторами дезоксицитидинкиназы (dCK). Функция тимидина заключается в блокировании способности рибонуклеотидредуктазы (RR), ограничении скорости фермента в синтезе дезоксирибонуклеотида, продуцировании дезоксицитидинтрифосфата (дЦТФ), одного из 4 структурных элементов ДНК. Единственный способ генерирования дЦТФ в раковых клетках заключается в рециклинге предварительно образованного дезоксицитидина из внеклеточной среды; дезоксицитидинкиназа является важной для процесса рециклинга; низкомолекулярные ингибиторы, которые блокируют активность dCK и в комбинации с тимидином страдают от голода раковые клетки дЦТФ, таким образом, предотвращая их пролиферацию.

Кроме того, предусмотренными являются композиции, такие как фармацевтические композиции, содержащие соединение, описанное в данном разделе (например, формулы (pI)), или его соль, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции в соответствии с данным разделом могут принимать форму, приемлемую для перорального, буккального, парентерального, назального, местного или ректального введения, или форму, приемлемую для введение путем инъекции, в.в., инфузии или ингаляции.

Соединения, описанные в данном разделе (например, соединение формулы (IA)), а также способы использования таких же, если не указано иное, включают все солевые формы соединений. Также включены все несолевая формы какой-либо соли соединения, описанного в данном разделе, а также другие соли какой-либо соли соединения, описанного в данном разделе. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела соли соединений представляют собой фармацевтически приемлемые соли. Желаемая соль основной функциональной группы соединения может быть получена по способам, известным специалистам в данной области путем обработки соединения кислотой. Желаемая соль кислотной функциональной группы соединения могут быть получены по способам, известным специалистам в данной области путем обработки соединения основанием. Примерами неорганических солей кислотных соединений включают, но не ограничиваются этим, соли щелочных и щелочно-земельных металлов, такие как соли натрия, соли калия, соли магния, соли висмута и соли кальция; соли аммония; и соли алюминия. Примеры органических солей кислотных соединений включают, но не ограничиваются этим, соли прокаина, дибензиламина, N-этилпиперидина, N,N'-дибензилэтилендиамина, триметиламина и триэтиламина. Примеры неорганических солей основных соединений включают, но не ограничиваются этим, гидрофторидные, гидрохлоридные, гидробромидные, гидроиодидные, сульфатные, гидросульфат-

ные, фосфатные, гидрофосфатные, дигидрофосфатные, карбонатные, бикарбонатные и нитратные соли. Примеры органических солей основных соединений включают, но не ограничиваются этим, тартрат, цитрат, малеат, фумарат и сукцинат.

В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела композиция вещества, включающая соединение, раскрытое в данном документе, может быть использована как терапевтический агент для лечения рака. В других вариантах реализации изобретения данного раздела композицию вещества используют как терапевтический агент для лечения аутоиммунных заболеваний. В некоторых случаях композицию вещества могут использовать как терапевтический агент для лечения рака и/или аутоиммунных заболеваний путем связывания dCK по способу, который селективно препятствует способности быстрой пролиферации патогенных клеток для восстановления и репликации их ДНК. Как правило, терапевтические агенты, используемые в способах данного раздела, объединяются с фармацевтически приемлемым носителем. Термин "фармацевтически приемлемый носитель", использованный в данном разделе, используют в соответствии с его общепринятым значением в данной области и предназначен, чтобы включать какой-либо и все растворители, дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда какие-либо общепринятые среды или агент несовместимы с активным соединением, такие среды могут быть использованы в композициях данного раздела. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции. Фармацевтическая композиция данного раздела формулируется так, чтобы быть совместимым с предполагаемым способом введения.

Примеры в данном документе предусматривают дальнейшее раскрытие аспектов и вариантов реализации изобретения данного раздела.

Хотя приведенный выше раздел описан в некоторых деталях посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, квалифицированному специалисту в данной области будет очевидно, что некоторые незначительные изменения и модификации будут применяться на практике в свете приведенного выше принципа. Таким образом, описание и примеры не должны быть истолкованы как ограничивающие объем какого-либо изобретения, описанного в данном документе.

Все ссылки, приведенные в данном документе, включая заявки на патенты и публикации, включены в данное описание в виде ссылки во всей их полноте.

V. Примеры.

1) Пример 1.

Дезоксицитидинкиназа (dCK) представляет собой дезоксирибонуклеозидкиназу, способную фосфорилировать дезоксицитидин, дезоксиаденозин и дезоксигуанозин до их монофосфатных форм с использованием или АТФ, или УТФ как доноров фосфорила.[1] Фосфорилирование dCK является скорость-лимитирующей стадией в биохимическом пути, ответственном за превращение реутилизационного дезоксицитидина в дЦТФ и в определенных типах клеток в dTTP, что делает их субстратами для ДНК полимераз. Помимо физиологической роли генерирования dNTP, dCK играет ключевую роль в активации нескольких нуклеозидных аналогах пролекарств ("nucs"), которые широко используются как противораковые.[2] Недавно dCK идентифицировали в кроветворении в лимфоидных и эритроидных клетках-предшественниках. Киназа также также участвует в регулировании G2/M транзиции в ответ на повреждение ДНК в раковых клетках.[6] Совсем недавно мы показали, что частичное ингибирование dCK активности, комбиниованное с пертурбациями нуклеотида de novo путях синтеза был синтетически летальным для острых лимфобластных лейкозных клеток, но не для нормальных гематопоэтических клеток.[7] Данные аспекты биологии dCK и ее потенциальная роль как новой терапевтической мишени при раке побудило нас разработать низкомолекулярные ингибиторы с их ферментной активностью.

Удачные соединения после скрининга с высокой пропускной способностью были разработаны, и последующая оптимизация молекул приводят к соединениям Ia и Ib.[8] Эта работа подробно описала взаимосвязь структура-активность (SAR) соединений, т.е. взаимосвязь между структурой малых молекул и их эффективности ингибирования. Недостаток кристаллической структуры комплекса между мишенью-ферментом и малой молекулой, традиционные исследования SAR противостоят неполному пониманию как наблюдаемым различиям в эффективности ингибирования между родственными молекулами. Это делает его трудным, чтобы уверенно идентифицировать сайты на ранее идентифицированных хитах, которые могут быть модифицированы для того, чтобы достичь аффинность связывания и/или увеличение метаболической стабильности. Соединения-прототипы Ia и Ib могут быть разделены на 4 различных структурных части (фиг. 1A). Часть A представляет собой пиримидиновое кольцо, которое связано через линкер (часть B) с 5-замещенным тиазольным кольцом (часть C), которое, в свою очередь, связано с фенильным кольцом (часть D). Концептуально, каждая из этих частей может быть модифицирована, чтобы достичь желаемых свойств "лекарственное средство-аналог". В предыдущей работе мы сфокусировались на тиазольном кольце, и кристаллическая структура dCK с одним из более ранних соединений дает основание предполагать, что 5-положение кольца может вмещать гидрофобные заместители, которые приводят к открытию того, что пропильная группа в 5-положение является выражено предпочтительной над

метильной группой.[8,9]

Для руководства и рационализации усилий медицинской химии в других частях молекулы, мы определили кристаллические структуры человеческого dCK с несколькими из ингибиторов, которые мы разработали. Кристаллические структуры освещают взаимосвязь между структурой фермента, тонкой структурой молекулы и его ингибирование эффективности. Данное усилие, в конечном счете, в результате привело к соединениям-прототипам Ia и Ib. К сожалению, несмотря на наномолярное сродство dCK к нашим соединениям-прототипам, при исследовании в анализе микросом печени данные соединения продемонстрировали низкую метаболическую стабильность. Данный недостаток был резюмирован с помощью фармакокинетических исследований у мышей.[8,7]

Для идентификации ингибиторов с улучшенными свойствами in vivo мы намереваемся исследовать дополнительные химические модификации, в частности те, которые поддерживают низкую наномолярную аффинность связывания соединений-прототипов. Кристаллические структуры хиральных соединений, описанных в данном документе, связанных с dCK, играли ключевую роль в установлении хиральности активной формы ингибитора. Путем комбинирования знаний органической химии с подробно описанной структурной информацией комплекс мишень-ингибитор мы идентифицировали соединение-прототип, которое сохраняет наномолярную аффинность для dCK, но получили значительную in vivo метаболическую стабильность. Данное соединение могло играть жизненно важную роль в какой-либо терапевтической стратегии, основанной на индукции чрезмерной стресс репликации ДНК путем пертурбации раковых dNTP пулов клетки.

Пиримидиновое кольцо (часть A молекул, фиг. 1A), как предсказывалось, было трудной частью молекулы для улучшения. Это происходит, потому что, как наблюдается в кристаллических структурах dCK в комплексе с соединениями-прототипами Ia и Ib (PDB коды 4L5B и 4KCG, соответственно) пиримидиновое кольцо ингибитора связывается с dCK в положении, почти идентичному тому, которое свойственно пиримидиновому кольцу физиологического субстрата dC, образуя несколько водородных связей, гидрофобных и π-π стекинг взаимодействий (фиг. 9). Этот режим связывания предполагал уже оптимизированное взаимодействие фермент-пиримидиновое кольцо. Для соединений Ia и Ib обе экзоциклические аминогруппы пиримидинового кольца формировали водород-связывающие взаимодействия с боковыми цепями Glu53, Gln97 и Asp133. Следовательно, не удивительно, что одновременное удаление обеих аминогрупп в результате приводит к полной потере ингибирования dCK.[8] В отличие от этого удаление одной аминогруппы для формирования соединения 1 (фиг. 2A), которое является идентичным к Ia за исключением того, что имеет одну экзоциклическую аминогруппу в пиримидиновом кольце (фиг. 1A), в результате приводит, аналогичным образом, к сильной аффинности связывания, как измерено для Ib (фиг. 1B и 2B). Для того чтобы объяснить, как аффинность 1 для dCK поддерживается только одной экзоциклической аминогруппой, мы искали кристаллическую структуру комплекса, но, к сожалению, нам не удалось получить кристаллы качества для дифракции. Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, мы полагаем, что единственная экзоциклическая аминогруппа, присутствующая в соединение 1 ориентируется в активном сайте dCK, таким образом, что она поддерживает его взаимодействие с Asp133, так как только в такой ориентации N-атом соседнего пиримидинового кольца может поддерживать свое взаимодействие с боковой цепью Gln97 (фиг. 9). Взаимодействие с Glu53, осуществляемое экзоциклической аминогруппой, когда она присутствует, вероятно, обеспечивает только умеренную дополнительную энергию связывания. В то время как одна экзоциклическая аминогруппа пиримидинового кольца является достаточной для сильного взаимодействия с dCK, в нашем анализе на основе CEM клеток соединение 1 демонстрировало намного более повышенное значение IC_{50} (21,8 нМ, фиг. 2B) по отношению к соединению Ib (4,9 нМ, фиг. 1B). Этот результат демонстрирует важность оценки взаимодействия между ингибитором и его мишенью, как в использовании ферментного анализа in vitro, так и в анализе на основе клеток. Из-за пониженного ингибирования активности dCK 1 в анализе на основе клеток все будущие соединения содержали две экзоциклические аминогруппы.

Мы исследовали, если положение N-атомов пиримидинового кольца является важным за счет синтеза соединения 2 (фиг. 2A). Данное соединение, как измерено, связывается ~50-раз более высоким IC_{50}^{app} по сравнению с очень похожим соединением-прототипом Ia (фиг. 1A), которое отличается только положением одного атома азота пиримидинового кольца. Мы определили с 2,0 Å разрешающей способностью кристаллическую структуру комплекса dCK-соединение 2, чтобы понять, как данное едва различимое изменение так сильно повлияло на взаимодействие с ферментом (см. табл. 1 по сбору данных и статистических уточнений).

Все исследованные соединения связываются с открытым состоянием фермента, который также является каталитически некомпетентным состоянием (для обсуждения об открытых и закрытых состояниях dCK см.[10,11]). Ингибиторы связываются в пределах глубокой полости, с пиримидиновым кольцом ингибиторов, расположенных наиболее глубоко, и занимающих такое же положение, занятое пиримидиновым кольцом нуклеозидного субстрата.[8,9] Тогда как, предотвращая связывание нуклеозидного субстрата, наши ингибиторы не препятствуют связыванию нуклеотида с донорным фосфорил-сайтом связывания. На самом деле все кристаллические структуры dCK в комплексе с ингибиторами также содержали UDP в донорном сайте.

Несмотря на существенно различные значения IC_{50}^{app} между соединением Ia (14,5 нМ) и соединением 2 (754 нМ) пиримидиновое кольцо данных родственных молекул взаимодействует с ферментом через аналогичные гидрофобные и полярные взаимодействия. Последние включают Glu53, Gln97 и Aspl33. Тем не менее, вся молекула 2 смещается приблизительно на 0,4 Å от дна полости связывание по отношению к соединению Ia (фиг. 2C и 10). Кристаллическая структура предполагает, что фактором, ответственным за данный сдвиг, является привлечение молекулы воды (оранжевый кружочек, фиг. 2C) N, присутствующим в пиримидиновом кольце в соединении 2. В отличие от этого для соединения Ia CH-группа в данном положении устраняет потенциал для водородной связи. Эта молекула воды также удерживается на месте за счет взаимодействий с Arg104 и Asp133. Следовательно, несмотря на образование этого дополнительного опосредованного водой взаимодействия с ферментом смещение от фермента, вызванное позволением молекуле воды связаться в этом положении, в конечном счете, снижает аффинность связывания 2.

Основываясь на данных результатах, мы решили сохранить первоначальную структуру пиримидинового кольца и сосредоточиться на других частях молекулы как потенциальных местах модификации. Мы исследовали влияние различных заместителей в различных положениях фенильной группы (часть D молекулы, фиг. 1A).

Таблица 1. Сбор данных и статистических уточнений

Комплекс	**2**	**3**	**4**	**5**
PDB коды	**4Q18**	**4Q19**	**4Q1A**	**4Q1B**
Статистика сбора данных				
Источник рентгеновского излучения и детектор	LS-CAT ID-G MARCCD 300	LS-CAT ID-G MARCCD 300	LS-CAT ID-G MARCCD 300	LS-CAT ID-G MARCCD 300
Длина волны (Å)	0,9785	0,9785	0,9785	0,9785
Температура (K)	100	100	100	100

Разрешающая способность[a] (Å)	2,0 (2,1-2,0)	2,09 (2,21-2,09)	1,90 (2,01-1,90)	2,15 (2,28-2,15)
Количество рефлексов				
Наблюдаемое	194185	201554	273877	191219
Уникальное	38119	32496	43643	30472
Полнота (%)	99,4 (99,9)	98,8 (93,9)	99,3 (98,4)	98,3 (97,4)
R_{sym} (%)	5,9 (54,7)	7,3 (67,9)	4,4 (62,9)	5,2 (55,2)
Среднее I/σ(I)	13,6 (2,7)	14,2 (2,5)	20,64 (2,54)	17,42 (2,87)
Пространственная группа	$P4_1$	$P4_1$	$P4_1$	$P4_1$
Элементарная ячейка (Å): a=b, c	68,75, 122,45	68,53, 119,79	68,66, 120,36	68,97, 121,94
Статистика уточнений				
Уточняющая программа	Refmac5	Refmac5	Refmac5	Refmac5
Доля удвоений	0,5	0,5	0,5	0,5
Rкрист. (%)	18,3	22,9	20,2	17,3
Rсв. (%)	21,6	26,1	25,0	25,3
Диапазон разрешающей способности (Å)	30,0-2,0	30-2,09	30-1,9	30-2,15
Молекулы белка на ат.ед.	2	2	2	2
Число атомов:				
Белок (белА, белВ)	1921, 1902	1877, 1889	1890, 1904	1877, 1873
Молекулы воды	88	103	105	92
Ингибитор	32 x 4	27 x 2	30 x 2	32 x 2
UDP	25 x 2	25 x 2	25 x 2	25 x 2
R.m.s. отклонение от идеального:				
Длина связи (Å)	0,012	0,013	0,011	0,012
Углы связи (°)	1,66	1,84	1,65	1,70
Средние B-факторы (Å^2)				
Белок (белА, белВ)	47,0, 46,9	30,1, 30,1	40,6, 40,7	53,8, 54,6
Молекулы воды	39,8	29,8	39,3	45,4
Ингибитор				
белА (301, 302)	46,6, 45,8	29,9, -	39,7, -	58,7, -
белВ (301, 302)	53,4, 41,2	30,0, -	40,1, -	58,3, -
UDP (белА, белВ)	51,6, 49,0	30,1, 30,3	41,4, 39,9	58,4, 58,5
Карта Рамачандрана (%):				
наиболее предпочтительные области	90,0	88,7	91,9	87,3
Дополнительно дозволенные области	9,5	10,8	7,6	12,3
Обычно дозволенные/ недозволенные области	0,5	0,5	0,5	0,4

Комплекс	**6**	**7**	**8**	**10R**
PDB коды	**4Q1C**	**4Q1D**	**4Q1E**	**4Q1F**
Статистика сбора данных				
Источник рентгеновского излучения и детектор	LS-CAT ID-G MARCCD 300	Rigaku RU-200 R-AXIS IV ++	Rigaku RU-200 R-AXIS IV ++	Rigaku RU-200 R-AXIS IV ++
Длина волны (Å)	0,9785	1,5418	1,5418	1,5418
Температура (K)	100	93	93	93
Разрешающая способность[a] (Å)	2,0 (2,12-2,00)	2,0 (2,12-2,00)	1,85 (1,96-1,85)	2,1 (2,23-2,10)
Количество рефлексов				
Наблюдаемое	194108	144843	158177	175767
Уникальное	36902	37712	46762	32727
Полнота (%)	98,8 (96,1)	99,5 (98,5)	96,9 (82,8)	99,5 (98,7)	
R_{sym} (%)	5,1 (71,6)	3,3 (67,1)	2,8 (40,4)	4,3 (75,6)
Среднее I/σ(I)	16,57 (2,04)	19,38 (1,79)	21,62 (1,99)	21,66 (2,12)
Пространственная группа	$P4_1$	$P4_1$	$P4_1$	$P4_1$
Элементарная ячейка (Å): a=b, c	68,66, 119,27	68,73, 120,62	68,74, 122,20	68,78, 121,28
Статистика уточнений				
Уточняющая программа	Refmac5	Refmac5	Refmac5	Phenix 1,8,4
Доля удвоений	0,5	0,5	0,5	0,5
Rкрист. (%)	20,5	19,1	17,4	20,3
Rсв. (%)	23,8	25,3	21,8	23,1
Диапазон разрешающей способности (Å)	30-2,0	30-2,0	30-1,85	30-2,1
Молекулы белка на ат.ед.	2	2	2	2
Число атомов:				
Белок (белA, белB)	1897, 1870	1890, 1842	1905, 1904	1897, 1897
Молекулы водыs	109	92	185	170
Ингибитор	32 x2	31 x2	29 x 4	33 x 2
UDP	25 x 2	25 x 2	25 x 2	25 x 2
R.m.s. отклонение от идеального:				
Длина связи (Å)	0,012	0,011	0,013	0,006

Углы связи (°)	1,72	1,68	1,67	1,03
Среднее B-фактор ($Å^2$)				
Белок (белA, белB)	29,5, 29,5	51,8, 51,8	37,6, 39,2	47,8, 48,7
Молекулы водыs	29,3	46,8	38,4	44,2
Ингибитор				
белA (301, 302)	29,4, -	55,8, -	43,1, 44,5	47,3, -
белB (301, 302)	29,5, -	52,8, -	40,0, 48,5	54,5, -
UDP (белA, белB)	29,6, 29,5	53,3, 53,6	38,5, 39,4	49,8, 51,2
Карта Рамачандрана (%):				
наиболее предпочтительные области	91,6	89,2	90,3	88,6
Дополнительно дозволенные области	8,4	10,3	9,2	10,9
Обычно дозволенные/ недозволенные области	0,5	0,5	0,5	0,5

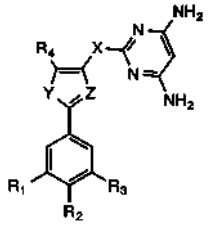
[a]Оболочка высокой разрешающей способности в круглых скобках.

Соединение без заместителей в фенильном кольце, но иначе идентичные соединению Ia, показали скромную эффективность в нашем CEM анализе, основанном на клетках (IC_{50} 37 нМ[8]). Добавление гидроксильной группы в мета-положении снижало IC_{50} в таком анализе приблизительно в половину (соединение 3, предварительно соединение 31[3], фиг. 3). Добавление более длинной гидроксиэтокси группы в таком положении (соединение 4, предварительно соединение 32[3]), давало IC_{50} ~1 нМ (фиг. 3). Первичные гидроксилы, как в 4, являются склонными к окислению или глюкуронидации, но данные исследования информируют нас насколько важен тип заместителя в мета-положении фенила.

Для того чтобы понять различие в аффинностях dCK между соединениями 3 и 4, мы определили структуры dCK в комплексе с данными молекулами, разрешали при разрешающей способности 2,09 Å и 1,9 Å соответственно (табл. 1). Структуры обнаруживают, что гидроксиэтоксигруппа, как присутствует в соединении 4, взаимодействует с боковыми цепями Ser144 и Ser146, в свою очередь, гидроксильная группа в том же положении в соединении 3 находится слишком далеко, чтобы сделать какие-либо взаимодействия ингибитор-фермент (фиг. 3C и 11). Мы относим данное дополнительное взаимодействие к верхнему связыванию соединения 4 по сравнению с соединением 3.

Исходя из важности заместителей в мета-положении фенила ясно, что отсутствие или наличие короткого заместителя, такого как гидроксил (соединение 3), уменьшает взаимодействие с dCK. С другой стороны, аффинность связывания, измерянная как в кинетическом анализе in vitro, так и в анализе на основе CEM клеток более длинные заместители - как присутствующие в соединениях Ia, Ib и 4 - являются сопоставимыми. Предшествующие кристаллические структуры dCK в комплексе с соединением Ia (PDB ID 4L5B) и Ib (PDB ID 4KCG) также показывают взаимодействие между заместителями в мета-положении фенила и ферментом - данный момент с Ser144. Дополнительные боковые цепи, такие как 2-фторэтокси поли(этиленгликоль) (n=2) $(ПЭГ)_2$ (S16, S17, S19), 2-гидроксиэтил $(ПЭГ)_2$ (S11), 2-метоксиэтил $(ПЭГ)_2$ (S20, S22-23, S25-28, S29), и 2-(4,6-диаминопиримидин-2-тио)этил $(ПЭГ)_2$ (S10) заместители, хорошо допускались в мета-положении (табл. 3).

Таблица 3. In vitro биологические данные в CEM клетках для соединений S1-S31[a,b]



Соединение	R_1	R_2	R_3	R_4	Y	Z	X	IC_{50} (нМ)
S1 DI-47	H	OCH_3	$OCH_2C(CH_3)_2OH$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CD_2S	4.0 (±2.2)
S2 DI-50	H	Прим [c]	$OCH_2CH_2NHSO_2Me$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	1,200(±312)
S3 DI-51	H	OCH_3	$OCH_2CH_2CH_2F$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	2.5 (±0.35)
S4 DI-52	H	OCH_2CH_2F	OCH_2CH_3	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	2.8 (±1.6)
S5 DI-53	H	F	$OCH_2CH_2CH_2F$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	31.7(±11.9)
S6 DI-54	H	F	OCH_2CH_2F	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	23.3 (±13)
S7 DI-55	H	H/A [d]	OCH_2CH_2F	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	6.8 (±1.7)
S8 DI-56	H	H/A [d]	OCH_2CH_2F	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CD_2S	30 (±4)
S9 DI-57	H	OCH_3	OCH_2CH_2F	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CD_2S	3.1 (±1.1)
S10 DI-58	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2X$ [e]	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	4.7 (±1.6)
S11 DI-59	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	1.06 (±0.15)
S12 DI-60	H	OCH_3	OCH_2CH_2F	CH_3	O	C	CH_2S	13,840(±280)
S13 DI-61	H	OCH_3	$OCH_2CH_2NHSO_2Me$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CD_2S	3.04 (±0.704)
S14 DI-62	H	OCH_2CH_2F	OCH_3	CH_3	O	C	CH_2S	276 (±179)
S15 DI-64	H	OCH_3	OCH_2CH_2F	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2CH_2	684 (±360)
S16 DI-65	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2F$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	4.22 (±1.98)
S17 DI-66	H	H	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2F$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	69.08 (±46.41)
S18 DI-67	H	OCH_2CH_2F	OCH_3	CH_3	S	C	CH_2S	262 (±150)
S19 DI-69	F	H	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2F$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	33.68 (±3.59)
S20 DI-70	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	3.31 (±0.44)
S21 DI-71	H	Прим [f]	OCH_2CH_3	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	CH_2S	2.37 (±0.44)
S22 DI-73	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	$CH_2CH_2CH_3$	S	N	$CH(CH_3)S$	6.0 (±2.4)
S23 DI-74	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	CH_3	S	N	$CH(CH_3)S$	8.03 (±3.16)
S24 DI-76	H	Прим [f]	OCH_3	CH_3	S	N	$CH(CH_3)S$	6.1 (±3.2)
S25 DI-77	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	Cpr [g]	S	N	CH_2S	23 (±20)
S26 DI-79	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	CH_3	S	N	CH_2S	9.1 (n=1)
S27 DI-80	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	Cpr [g]	S	N	$CH(CH_3)S$	3.7 (n=1)
S28 DI-81	H	OCH_3	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	Фенил	S	N	$CH(CH_3)S$	98.9 (n=1)
S29 DI-83	H	Прим [h]	$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$	CH_3	S	N	$CH(CH_3)S$	61.4 (n=1)
S30 DI-84	H	Прим. [h]	$OCH_2CH_2NHSO_2Me$	CH_3	S	N	$CH(CH_3)S$	200.3(n=1)
S31 DI-85	F	H	$OCH_2CH_2NHSO_2Me$	CH_3	S	N	$CH(CH_3)S$	9.07 (±2.24)

[a]Значения IC_{50}, основанные на ингибировании захвата ^{3}H-дезоксицитидина (dCyd) в CEM клетках. Представленные значения являются средними ±SD, по меньшей мере, n = 2 независимых эксперимента. [b]Представленные значения для n = 1. [c]R_2=N(SO_2Me)($CH_2CH_2NHSO_2$Me). [d]2,4-дизамещенное пиридиновое кольцо. [e]3,5-диаминопиримидинтиол. [f]R_2=$O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_3$ [g]Cpr=циклопропил. [h]R_2=$OCH_2CH_2NHSO_2$Me.

Определенная природа заместителя в мета-положении фенила может не быть критической, при условии, что он содержит полярную группу, которая может распространяться на близость Ser144/Ser146.

Мы получили соединение 5 (предварительно соединение 28[3]), которое только отличается от соединения Ib отсутствием заместителя в пара-положении (фиг. 4A). Измеренные in vitro значения аффинности связывания (IC_{50}^{app}; K_i^{app}) соединения 5 почти идентичны тем, что у Ib (фиг. 4B). Это указывает на то, что заместители в пара-положении не требуются для сильного связывания, и объясняется кристаллическими структурами dCK в комплексе с соединениями 5 и 6 (предварительно соединение 30[3]), что показывает почти идентичный способ связывания к тому, который также является очень подобным к наблюдаемому для соединения Ib (фиг. 4C и 12). Кристаллические структуры также обнаружили, что никакие значительные взаимодействия ингибитор-фермент не происходят через пара-заместитель, если он присутствует. Этот вывод подтверждается свойствами соединения 6, которое в отличие от метоксигруппы в соединениях Ia и Ib имеет более длинную гидроксиэтоксигруппу, но подобную аффинность связывания. Следовательно, in vitro аффинности связывания в значительной степени не изменяется между тем, как фенильная группа не имеет заместителя в пара-положении, имеет метокси или более длинный гидроксиэтокси. Тем не менее, мы обратили внимание на ~ 10-кратную разницу между соединениями 5 и 6 в анализе на основе CEM клеток, где соединение 5 является менее эффективным. Кроме того, заместители в пара-положении фенильного кольца, такие как 2-фторэтокси (S4, S14, S18), фтор (S5, S6), метоксиметил с терминальными $(ПЭГ)_2$ (S21, S24), и N-замещенный метансульфонамид (S29, S30) относительно хорошо переносились (табл. 3). Группы, присоединенные к тиазолу, такие как заместители 4-пиридинил (S7), мета-монозамещенный фенил (S17) и 3,5-дизамещенное фенильное кольцо (S31), также допускались (табл. 3). Таким образом, тогда как нет явного предпочтения для аффинности связывания, наличие даже

небольшого заместителя в пара-положении фенильной группы улучшает соответствующие измерения на основе клеток. В результате, большинство последующих соединений содержали метоксигруппу в этом положении.

Мы продемонстрировали, что природа заместителя в 5-положении тиазольного кольца (часть С молекулы, фиг. 1А) играет ключевую роль в аффинности связывания.[9] Короче говоря, мы сравнивали те, которые не имеют заместителя в положении, с теми, которые имеют метил, этил или пропил. Именно последним является то, значительно улучшило аффинность связывания, и в результате, соединения с пропилом в 5-положении стали соединения-прототипы (т.е. соединение Ia, Ib, фиг. 1). Интересно отметить, что соединения с небольшим заместителем/без заместителя в 5-положении тиазола, как наблюдалось, связывали две молекулы ингибитора на dCK активный сайт. В отличие от этого наблюдалось, что прочно связывающиеся пропил-содержащие молекулы связывались с одной молекулой ингибитора на dCK активный сайт.[9] В нашем предыдущем сообщении мы обсуждаем вовлечение одинарного/двойного связывания молекул ингибитора с dCK; короче говоря, мы приходим к выводу, что связывание двух молекул не требуется для сильного связывания и что молекула ингибитора, связанная с тем, что мы называем как положение-1, является ответственной за наблюдаемое ингибирование активности dCK, в свою очередь, молекула, связанная в положении-2, значительно не повышает ингибирование dCK.

Тем не менее, при исследовании метаболической стабильности мы обнаружили, что содержащие пропильную группу соединения Ia и Ib являются менее стабильными по сравнению с теми, которые имеют более короткую метильную группу, например соединение 15a (табл. 2). Мы также исследовали активность циклопропильных и фенильных групп в 5-положении тиазолила (табл. 3). Циклопропильный аналог (S27) имел хорошее значение IC_{50}, но оно падало в PET L-FAC анализе, который описан в [8]. Фенильный аналог (S28) продемонстрировал низкую аффинность. Поэтому мы были вынуждены вернуться к тиазольному кольцу с метильным заместителем несмотря на более слабые взаимодействие с dCK. Для того чтобы компенсировать потерю аффинности, которая обеспечивается пропильной группой тиазола, мы искали модификации для компенсирования, что должно восстановить in vitro аффинность связывания и в то же время поддерживать приемлемую метаболическую стабильность. С этой целью мы решили исследовать модификации в фрагменте линкера (часть В соединений, фиг. 1А).

Таблица 2. Анализ человеческого микросомального внутреннего клиренса[a]

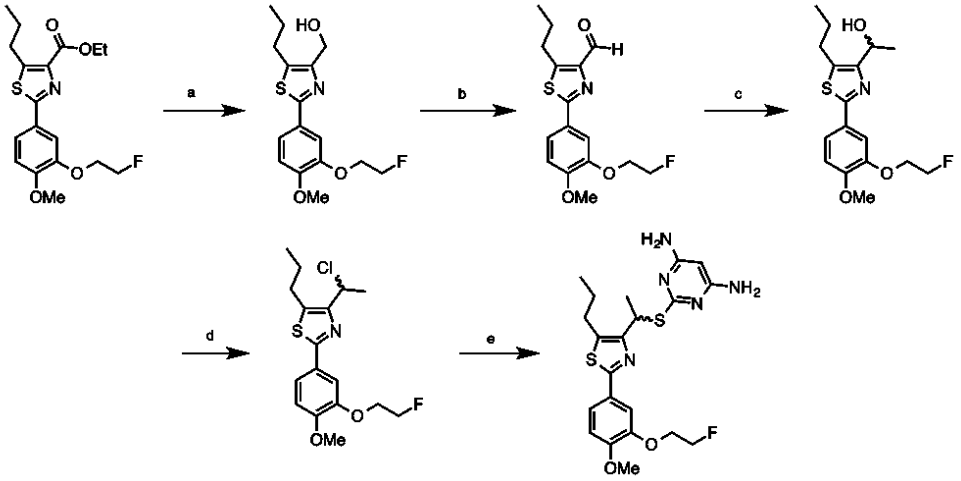
Соединение	NADPH-зависимый CL_{int}[a] (мкл $хв^{-1}$ $мг^{-1}$)	NADPH-зависимый $T_{1/2}$[b] (хв)	Комментарии
Верапамил	201	11,5	Контроль с высоким клиренсом
варфарин	0,0	>240	Контроль с низким клиренсом
Ia	561	4,1	
Ib	870	2,7	
15a (Murphy et al)	142	16,3	
7(R/S)	419	5,5	
8(R/S)	254	9,1	
10R	22,7	102	

[a]Исследуемая концентрация соединений составляла 1 мкМ.

Группа $-S-CH_2-$ действует для связывания пиримидинового и тиазольного колец наших соединений. Мы исследовали множество различных линкеров, таких как его дейтерированный аналог ($-S-CD_2-$), с целью кинетического исследования изотопов. Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, мы предположили, что если линкер был вовлечен в гидролитический метаболизм, то из-за кинетического изотопного эффекта дейтерированный ($-S-CD_2-$) аналог будет показывать улучшение в метаболической стабильности. Дейтериевые аналоги (S1, S8, S9, S13) имели аффинность, аналогичную их изотопологам, как ожидалось (табл. 3). Однако дейтерированные соединения не показали улучшение в анализе печени PET L-FAC, указывая на то, что гидролитический механизм, вероятно, не участвует в метаболизме-$S-CH_2-$ линкер. Мы также исследовали замещение атома серы в группе $-S-CH_2-$ с метиленовой группой ($-CH_2CH_2-$). Замещение атома серы линкера на атом углерода в результате приводило к снижению аффинности dCK и метаболической стабильности (табл. 3). Мы исследовали линкер, в котором метилен был замещен, чтобы содержать метильную группу ($-S-CH(CH_3)-$). Данные рацемические с метильным линкером соединения показали обнадеживающие биологические результаты и повышенную метаболиче-

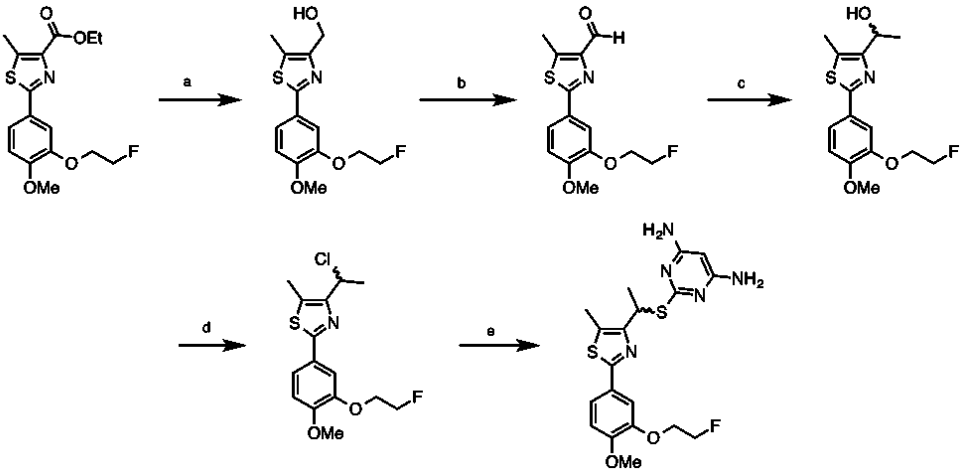
скую стабильность (см. схему 1 и 2 для синтеза соединений 7 и 8). Таким образом, мы тщательно изучили синтетический путь в попытке уменьшить стадии синтеза и улучшить общий выход. Нам удалось разработать шестистадийный синтетический путь в направлении 9 с общим выходом 43% (схема 3). Коммерчески доступный 3-гидрокси-4-метоксибензонитрил A подвергали действию водного раствора сульфида аммония в щелочных условиях с получением тиоамида B. Циклизация с образованием тиазольного ядра C достигалась за счет конденсации тиоамида B с 4-бромпентан-2,3-дионом[13] в кипящем этаноле. Введение ПЭГ цепи в фенильное кольцо соединения D с 13-хлор-2,5,8,11-тетраоксатридеканом[14] в основных условиях достигалось с 89% выходом. Восстановление полученного в результате кетон-содержащего соединения диизобутилалюмогидридом (DIBAL-H) дает рацемический вторичный спирт E с высоким выходом. Спирт E превращали в соответствующий хлорид F, используя тионилхлорид. Ацилхлорид подвергали реакции в сыром виде с 4,6-диамино-2-меркаптопиримидином с образованием продукта 9R/S.

Схема 1. Способ синтеза рацемического соединение 7 с метильным линкером



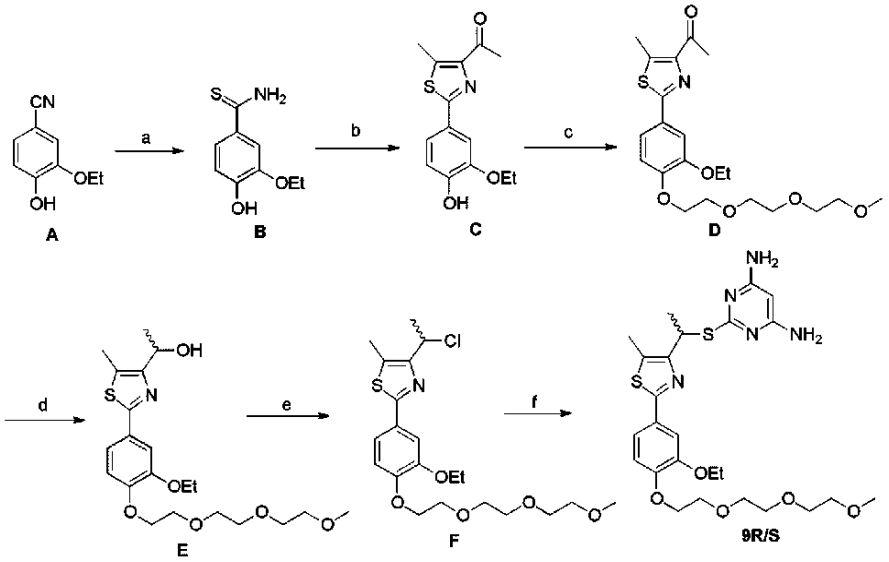
Реагенты и условия: (a) диизобутилалюмогидрид, тетрагидрофуран, (предыдущая работа); (b) перйодат Десса-Мартина, дихлорметан, 23°C, 80%; (c) метилмагния йодид, тетрагидрофуран, 0°C, 86%; (d) тионилхлорид, дихлорметан, 23°C, 96%; (e) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин, калия карбонат, ДМФ, 80°C, 66%.

Схема 2. Способ синтеза рацемического соединение 8 с метильным линкером



Реагенты и условия: (a) диизобутилалюмогидрид, тетрагидрофуран (предыдущая работа); (b) перйодат Десса-Мартина, дихлорметан, 23°C, 70%; (c) метилмагния йодид, тетрагидрофуран, 0°C, 68%; (d) тионилхлорид, дихлорметан, 23°C, 94%; (e) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин, калия карбонат, ДМФ, 80°C, 64%.

Схема 3. Способ синтеза соединения 9R/S с метильным линкером



Реагенты и условия: (a) $(NH_4)_2S$ (20% в H_2O), пиридин, Et_3N, 60°C, 85%; (b) 4-бромпентан-2,3-дион, EtOH, кипячение, 95%; (c) 13-хлор-2,5,8,11-тетраоксатридекан, Cs_2CO_3, ДМФ, 50°C, 89%; (d) DIBAL-H, ДХМ, -78°C, 92%; (e) $SOCl_2$, ДХМ, 0°C до к.т.; (f) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин, K_2CO_3, ДМФ, 75°C, 65% за последние две стадии.

Линкер -S-CH(CH_3)- вводили в соединение, которое содержало пропильную группу в 5-положении тиазольного кольца (соединение 7), и в соединение, которое вместо пропильной группы содержало метил (соединение 8) - фиг. 5A. Как упоминалось выше, логическим объяснением соединения 8 было предсказанное улучшение метаболической стабильности. Интересно отметить, что, в свою очередь, ранние соединения с пропил-тиазольным кольцом показали прочное связывание с dCK по сравнению с аналогичными метил-тиазольными соединениями, сейчас мы измерили лучшее связывание с метил-содержащим соединением 7 по сравнению с пропил-содержащим соединением 8 (фиг. 5B). Следовательно, близость заместителя тиазольного кольца (пропила или метила) к заместителю метил-линкера в результате приводила к тому, что большая пропильная группа не являлась столь приспосабливающейся в активном сайте dCK. Несмотря на улучшенные in vitro параметры связывания для 8 по сравнению с 7, анализ на основе клеток дал подобные значения IC_{50}, при этом согласующийся с тем, что 8 является превосходящим (фиг. 5B).

Оба соединения 7 и 8 получали как рацемические смеси; введенный линкер - метильная группа делает такое положение новым хиральным центром (стрелка, фиг. 5A). Для того чтобы оценить, какой из двух энантиомеров является активным ингибитором dCK, мы определили кристаллическую структуру dCK в комплексе с соединениями 7 и 8 (установленную с разрешающей способностью 2,0 и 1,85 Å соответственно, табл. 1). Соединение 7 связывает, как с единственной молекулой, с dCK, специфически в положение-1. Интересно отметить, что несмотря на тот факт, что рацемическую смесь 7 использовали для формирования комплекса с dCK, кристаллическая структура обеспечивает однозначное доказательство связывания R-изомера в положении-1 (фиг. 5C и 13). Аналогичным образом, критическое рассмотрение структуры комплекса между рацемическим 8 и dCK показывает, что это R-изомер, который занимает наиболее соответствующее положение-1 сайта связывания (фиг. 5D и 13). Поскольку соединение 8 содержит метильный заместитель в тиазольном кольце, который позволяет молекуле также занимать положение-2, в действительности мы также наблюдаем соединение 8 в том положении. Тем не менее, в свою очередь, R-изомер 8 является таким, что связывается с положением-1, S-изомер является таким, что связывается с положением-2 (фиг. 5E и 13).

Положение-1 может представлять собой сайт связывания для данного семейства ингибиторов. Это позволило бы предположить, что измеренные in vitro значения ингибирования рацемического 8 отражают преимущественное связывание R-изомера. Для проверки данного предположения мы синтезировали соединение 9, которое представляет собой небольшую модификацию 8 (природа заместителей фенильной группы), но прежде всего, имело рацемическую смесь, которую разделяли с получением чистых изомеров 9R и 9S (фиг. 6A). Мы определили in vitro аффинности связывания энантиомерно чистых соединений и наблюдали, что 9S имеет в ~400 раз более слабую аффинность связывания по сравнению с 9R (фиг. 6B). В дополнение к предоставляемым четким доказательствам, что R-форма является такой, что ответственна за тесное взаимодействие с dCK, этот результат также подтверждает нашу интерпретацию на основе структуры, что положение-1 является одним наиболее соответствующим сайтом связывания ингибитора для ингибирования dCK, и где положение-2 занимается из-за высокой концентрации ингибитора, использованного при формировании кристаллизации.

Обнаружив то, что R-изомер соединений 7, 8 и 9 выступает ответственным за ингибирование dCK,

мы намереваемся разработать асимметричный синтез (схема 2). Хиральный синтез, разработанный нашей группой для соединения 10R, которое является близким аналогом 8, показывает хиральную реакцию Кори-Бакши-Шибата (CBS)[15] кетона D. Хиральный спирт E синтезировали в соответствии с данным способом с энантиомерным избытком 96%, как определено с помощью хиральной ВЭЖХ. Используя метансульфоновый или тозилсульфоновый ангидрид, чтобы получить сульфонаты в разных основных условиях, таких как Et_3N, пиридин или DMAP, в результате приводила к устранению алкена, предположительно из-за стабильности вторичного бензильного типа карбокатиона. Использование трифторуксусного ангидрида (ТФУА) при 0°C преобразовывало спирт E в соответствующий трифторацетат (ТФУ) F без существенного снижения % э.и. сложного эфира. В заключение, соединение F подвергали взаимодействию с 4,6-диамино-2-меркаптопиримидином, получая 10R с 61% выходом после двух стадий с энантиомерным избытком 40%. Предположительно, часть реакции осуществляется за счет прямого SN2 пути, в то время как другая часть осуществляется за счет SN1 пути, и, таким образом, получали частично рацемизированный материал. Хиральное разделение с помощью перекристаллизации генерировало 10R с энантиомерным избытком более 90%. Аналогичным образом, (S)-(-)-2-метил-CBS-оксазаборолидин использовали в восстановлении CBS, чтобы синтезировать 10S.

Соединение 10R (фиг. 6A), как измерено, имеет очень сходные in vitro аффинности связывания, как и 9R (фиг. 6B). Важно отметить, что точно также, как аффинность 9S была значительно снижена по сравнению с 9R, аффинность к dCK 10S была значительно снижена по сравнению с 10R. Это подтвердило преимущество dCK для соединений, которые содержат R-изомер линкера.

Мы установили кристаллическую структуру комплекса dCK-10R. На основании предыдущей структуры с соединением 9 (наблюдая 9R, связанную с положением-1) и наши кинетические результаты с использованием энантиомерно чистых 9S, 9R, 10S и 10R (наблюдая более высокую аффинность для R-изомеров), и так как кристаллы были образованы с энантиомерно чистым 10R, мы ожидали, что 10R связывается только в положении-1. Кроме того, при отсутствии S-изомера мы ожидали, что вакантное положение-2 сайта связывания. В действительности, кристаллическая структура комплекса dCK-10R показала одну молекулу ингибитора в положении-1 (фиг. 6C). Этот результат предполагает, что R-изомер имеет очень низкую аффинность к сайту связывания в положении-2. Примечательно, что в то время как взаимодействие между R-изомером и dCK ограничивается сайтом связывания положения-1, это не уменьшает аффинность связывания для фермента.

Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, мы выдвинули гипотезу стерические факторы, касающиеся ингибитора и фермента, где хиральная метильная группа линкера сталкивается с ферментными остатками в случае одного изомера, но не другого обеспечивающего эффективность. Тем не менее, критическое рассмотрение установленных кристаллических структур с соединениями 8(R/S) и 10R не поддерживает данную интерпретацию; мы могли бы моделировать S-изомер, связанный с положением-1 (фиг. 5D), и R-изомер, связанный с положением-2 (фиг. 5E), не имеющий видимых столкновений.

Сравнение способа связывания между 8R и 8S показывает, что относительные ориентации колец сильно отличаются (фиг. 14). Другими словами, каждый изомер регулировал свою конформацию к наилучшим образом подходящему своему сайту связывания (т.е. индуцированная подгонка). Это предполагает, не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, что фермент диктует относительные ориентации между пиримидиновым кольцом, линкером, тиазольным кольцом и фенильным кольцом. Мы рассмотрели теоретическую модель S-изомера, которая сориентируется тем же образом, как и 8R. В действительности, где для 8R в положении-1 наблюдаемое расстояние между хиральным метилом линкера и метильной группой тиазольного кольца составляет 4,2 Å (фиг. 7A), для моделированного 8S, связанного с положением-1, такое расстояние 2,5 Å будет неблагоприятным (фиг. 7B). Аналогичным образом, в свою очередь для 8S в положении-2 наблюдаемое расстояние между хиральным метилом и метилом тиазола составляет 4,4 Å (фиг. 7C), для моделированного R-изомера, принимающего такую же конформацию как 8S, такое расстояние 2,6 Å будет неблагоприятным (фиг. 7D). Следовательно, точный хиральный выбор или положения-1, или положения-2 имеет место из-за фермента, диктующего конкретную ориентацию ингибитора, которая значительно отличается между сайтами связывания. В случае положения-1, когда ориентация не является совместимой с S-изомером, и для положение-2, когда ориентация не является совместимой с R-изомером.

Используя компьютерные моделирования, мы получаем качественную оценку конформационного пеналти, за которое несли ответственность 8R и 8S после связывания с белком. Конформационное пеналти представляет собой разницу энергии между предпочтительной геометрией раствор-фаза субстрата и геометрии, которую он принимает при связывании

$$\Delta E = E_{раствор} - E_{связыванный}.$$

Каждый энантиомер состыковался со сольватированным белком в положении-1 и давали уравновесить (см. детали в экспериментальной части и фиг. 15). Уравновешенные, состыкованные структуры ингибитора были удалены из белка, и их энергии были оценены с помощью полуэмпирического PDDG/PM3 способа[16-21]. Несвязанные структуры 8R и 8S были оптимизированы в неявном растворителе, чтобы определить их низкоэнергетические конформации раствор-фаза. Как и в случае связанных структур, энергии несвязанных структур были оценены с использованием PDDG/PM3. Полученные в резуль-

тате энергии использовали для получения качественных конформационных пеналти для каждого энантиомера. Конформационный пеналти для 8S был почти удвоенным конформационным пеналти для 8R (на 45 ккал/моль больший пеналти для 8S), далее демонстрируя, что 8R должен испытывать намного меньшую неблагоприятную структурную перестройку для того, чтобы связать с белком.

Другой способ рассмотрения данного вопроса заключается в исследовании энергии ингибитора как функции вращения вокруг связи, которая соединяет тиазольное кольцо с хиральным атомом линкера (связь, обозначенная * на фиг. 7A-D). Для 8R, связанного с dCK в положении-1, наблюдаемый торсионный угол, который указывает данное вращение, составляет -59°, и посадки низкоэнергетической конформации (фиг. 7E). В отличие от этого моделированный S-изомер в данном сайте связывания должен иметь торсионный угол 189°, который является явно высокоэнергетической конформацией (фиг. 7F). Та же картина наблюдается и для положения-2; S-изомер связывается с dCK с торсионным углом -326°, который является низкоэнергетической конформацией, тогда как моделированный R-изомер в таком положении является высокоэнергетической конформацией (фиг. 7H). Следовательно, хиральная селективность не идет непосредственно от фермента стерически в пользу одного изомера над другим. Скорее всего, фермент диктует конкретную конформацию, и селективность идет от одного изомера, который способен утверждать, что конкретная конформация, в свою очередь, энергетический пеналти другого изомера устраняет его связывание.

В дополнение к объяснению хиральной селективности для соединений, обсуждаемых здесь, это понимание может быть использовано для создания хиральных молекул, которые связываются с каким-либо сайтом связывания. В частности, предсказание было бы таким, что замещение метильной группы тиазола на атом водорода будет исключать какое-либо стерическое столкновение с хиральной метильной группой, и, следовательно, какой-либо изомер может связываться с каким-либо сайтом связывания ингибитора.

Мы определили метаболическую стабильность 10R в стандартном микросомальном анализе клиренса печени. NADPH-зависимый $T_{1/2}$ 10R был в ~37 раз больше, чем у нашего предыдущего соединения-прототипа Ib (табл. 2). Мы затем тестировали соединение 10 у мышей, используя предварительно описанный анализ позитронно-эмиссионной томографии (PET).[8] В свою очередь, более раннее соединение-прототип Ib сохраняло только ~25% ингибирования активности dCK через 4 ч после дозирования соединения 10 путем внутрибрюшинной инъекции[3] (данной как рацемическая смесь), которое десонстрировано >50% ингибирование активности dCK в данной точке времени (фиг. 8A). Кроме того, через 8 ч после обработки соединением 10 ингибирование dCK было еще выше 30%. Затем мы определили фармакокинетические свойства соединения 10, чтобы сравнить с нашими предыдущими соединениями-прототипами Ia и Ib.[7,8] Как показано на фиг. 8B, фармакокинетические свойства соединения 10 были значительно улучшены по сравнению с предварительно опубликованными значениями для соединений Ia и Ib.[7,8] В совокупности, данные полученные результаты демонстрируют, что введение хирального линкера плюс замещения пропильного заместителя тиазольного кольца на метильную группу дает ингибитор dCK с улучшенной метаболической стабильностью.

Исследование структуры и ингибирования, проведенные с использованием как очищенного рекомбинантного фермента, так и анализа на основе клеток, соединений, обсуждаемых здесь, показали и логически обосновали основные детерминанты для связывания с dCK, и также направляли тип и расположение заместителей. Это уведомляло развитие исходных выводов, соединений Ia и Ib. Данные соединения содержат пропильную группу в 5-положении тиазольного кольца, поскольку, как показано ранее, пропильный заместитель обеспечивает улучшенную аффинность для dCK по сравнению с соединениями с метильной группой в положении. Данная пропильная группа, усиливающая аффинность, поступалась метаболической стабильностью по сравнению с соединениями, содержащими метильную группу в таком положении. Это заставило нас вернуться к более слабому связыванию, но более метаболически стабильному остову метильной группы в тиазольном кольце. С целью улучшения метаболической стабильности испытывали хиральный метилен метил серы линкер между тиазола и пиримидиновых остатков. С целью улучшения метаболической стабильности исследовали хиральный метилсера метиленовый линкер между тиазольными и пиримидиновыми фрагментами. Данный линкер, как обнаружено, предоставляет два положительных эффекта: один, исходя из аффинности к dCK, модифицированный линкер компенсировал отсутствие пропильной группы тиазола, и два соединения демонстрировали улучшенную метаболическую стабильность. Взаимодействие dCK с соединениями, содержащими данный линкер, является специфическим для R-изомера. Это было доказано с помощью кристаллической структуры dCK-ингибитор и с помощью сравнения аффинности связывания R по отношению к S энантиомерам. Новое соединение-прототип 10R является перспективным ингибитором dCK, который путем пертурбации dNTP пулов и индуцирования перегрузки стресс репликации ДНК может быть использован в комбинации с другими лекарственными средствами, чтобы специально инициировать синтетическую летальность в раковых клетках.

Материалы. Общие лабораторные реагенты были приобретены у Fisher (Pittsburgh, Pennsylvania, США) и Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, США). Нуклеотиды были получены от Sigma. Все ингибиторы были синтезированы в UCLA. Chiral Technologies Inc. (800 North Five Points Road, West Chester, PA 19380 США) выполняли разделение R и S энантиомеров.

Химия. Общие процедуры. Если не указано иное, реакции проводили в высушенной в сушильном шкафу стеклянной посуде в атмосфере азота, используя коммерчески доступные безводные растворители. Растворители, используемые для экстракции и хроматографии не были безводными. 4,6-Диамино-2-меркаптопиримидин получали при высушивании гидрата при динамическом вакууме при 110°C в течение 20 ч. Все другие реагенты, которые получали из коммерческих источников, были реагентами качества и использовали без дополнительной очистки, если не указано иное. Реакционные смеси и хроматографические фракции анализировали, используя тонкослойную хроматографию (ТСХ), используя Merck предварительно покрытые силикагелем 60 F_{254} стеклянные пластины (250 мкм). Визуализацию осуществляли, используя ультрафиолетовый свет, ванилиновое окрашивание, окрашивание перманганотом, или окрашивание n-анисовым альдегидом. Флеш-колоночную хроматографию выполняли, используя E. Merck силикагель 60 (230-400 меш) с помощью сжатого воздуха. ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектры регистрировали на ARX500 (500 МГц), Avance500 (500 МГц) или Avance300 (300 МГц) спектрометрах. Химические сдвиги регистрировали в миллионных долях (м.д., δ), используя пик остаточного растворителя как стандарт. Константы взаимодействия, J, представлены в Герцах (Гц) резонансные характеристики сообщаются с нотациями, как следующие: ш (широкий), с (синглет), д (дублет), т (триплет), кв (квартет), и м (мультиплет). Данные электроспрей масс-спектрометрии собирали с Waters LCT Premier XE времяпролетного устройства для измерения размера частиц контролировали, используя MassLynx 4,1 программное обеспечение. Образцы растворяли в метаноле и вводили, используя непосредственно петлевой инжектор от Waters Acquity UPLC в Multi-Mode источнике ионизации. Чистота всех конечных соединений, как определено, составляла >95%. Аналитический анализ ВЭЖХ выполняли в Knauer Smartline ВЭЖХ системе с Phenomenex колонкой с обращенной фазой Luna (5 мкм, 4,6×250 мм) с встроенным УФ детектором Knauer (254 нм). Подвижная фаза: A: 0,1% ТФУ в H_2O, B: 0,1% ТФУ в MeCN. Градиент элюента определяют для каждого описанного соединения. Процентные значения энантиомерного избытка (% э.и.) определяли с помощью хиральной ВЭЖХ на CHIRALPAK®IA-3/IA колонке иммобилизованного типа на основе полисахарида (3 мкм, 4,6×150 мм) с встроенным УФ детектором Knauer (310 нМ). Подвижная фаза: A: 0,1% ТФУ в гексанах, B: 0,1% ТФУ в пропанол. Градиент элюента: 50% фазы A и 50% фазы B. Хроматограммы собирали с помощью GinaStar (Raytest USA, Inc.; Wilmington, NC, USA) аналога цифрового преобразователя и GinaStar программного обеспечения (Raytest USA, Inc.).

Для схемы 1.

3-Этокси-4-гидроксибензотиоамид (B). К смеси 3-этокси-4-гидроксибензонитрила A (2,50 г, 15,3 ммоль) в пиридине (35 мл) и триэтиламине (2,5 мл) добавляли раствор сульфида аммония (20 мас.% в H_2O, 15,65 мл, 46,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 60°C. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Полученный в результате остаток промывали насыщенным солевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4, концентрировали в вакууме и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (3:1 этилацетат: гексаны), получая B (2,56 г, 13,0 ммоль, 85%) в виде желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 7,68 (д, J = 2,1 Гц, 1H), 7,48 (ш с, 1H), 7,28 (дд, J = 8,5, 2,1 Гц, 1H), 7,11 (ш с, 1H), 6,89 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,03 (с, 1H), 4,21 (кв, J = 6,9 Гц, 2H), 1,47 (т, J = 6,9 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, Ацетон-d_6) δ 200,5, 150,3, 145,8, 131,0, 121,0, 114,0, 112,6,64,3, 14,1.

1-(2-(3-Этокси-4-гидроксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-он (C). Смесь тиоамида B (1,50 г, 7,6 ммоль) и 4-бромпентан-2,3-диона (2,04 г, 11,4 ммоль) в этаноле (40 мл) перемешивали в условиях кипячения в течение 4 ч. Полученную в результате смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемое тиазольное промежуточное соединение C (2,00 г, 7,2 ммоль, 95%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 7,47 (д, J = 1,8 Гц, 1H), 7,35 (дд, J = 8,2, 1,8 Гц, 1H), 6,96 (д, J = 8,1 Гц, 1H), 5,93 (с, 1H), 4,23 (кв, J = 7,2 Гц, 2H), 2,77 (с, 3H), 2,71 (с, 3H), 1,50 (т, J = 6,9 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (75 МГц, $CDCl_3$) δ 196,0, 162,8, 148,9, 148,0, 146,3, 142,9, 125,9, 120,5, 114,8, 109,4, 64,9, 29,5, 14,9, 13,6.

1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-он (D). К раствору тиазольного промежуточного соединения C (1,66 г, 6,0 ммоль) в ДМФ (35 мл) добавляли Cs_2CO_3 (3,13 г, 9,6 ммоль) и 13-хлор-2,5,8,11-тетраоксатридекан (2,19 г, 12,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 50°C. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным солевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным Na_2SO_4, концентрировали в вакууме и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (1:1 этилацетат: гексаны), получая желаемое кетон D (2,26 г, 5,3 ммоль, 89%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,48 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,38 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,94 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 4,24 - 4,20 (м, 2H), 4,17 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,93 - 3,89 (м, 2H), 3,79 - 3,75 (м, 2H), 3,70 - 3,63 (м, 4H), 3,57 - 3,53 (м, 2H), 3,37 (с, 3H), 2,77 (с, 3H), 2,71 (с, 3H), 1,47 (т, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 196,0, 162,5, 150,8, 149,4, 149,0, 143,1, 126,9, 119,8, 114,0, 111,4, 72,1, 71,1, 70,8, 70,7, 69,7, 69,0, 64,9, 59,2, 29,5, 15,0, 13,6.

1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-ол (E). К перемешиваемому раствору кетона D (1,06 г, 2,5 ммоль) в CH_2Cl_2 (35 мл), охлажденного до -78°C, медленно добавляли диизобутилалюмогидрид (1,0М в ТГФ, 10 ммоль, 10 мл). Реакционной смеси давали нагреться до 23°C и перемешивали в течение 1 ч. Смесь охлаждали до 0°C и медленно гасили насыщенным водным раствором тартрата натрия-калия. Мутный раствор перемешивали в течение 1 ч при 23°C, пока раствор не стал снова прозрачным. Полученный в результате раствор экстрагировали этилацетатом, промывали насыщенным солевым раствором, сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме, получая желаемый спирт E (978 мг, 2,3 ммоль, 92%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,44 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,33 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,89 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 4,91 (кв, J = 6,5 Гц, 1H), 4,22 - 4,17 (м, 2H), 4,13 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,91 - 3,86 (м, 2H), 3,76 - 3,72 (м, 2H), 3,69 - 3,61 (м, 4H), 3,55 - 3,51 (м, 2H), 3,35 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 1,52 (д, J = 6,0 Гц, 3H), 1,44 (т, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 164,3, 155,1, 150,0, 149,0, 127,2, 125,8, 119,3, 113,8, 111,0, 71,8, 70,8, 70,6, 70,4, 69,5, 68,7, 64,6, 64,4, 58,9, 24,0, 14,7, 10,7.

4-(1-Хлорэтил)-2-(3-этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол (F). К перемешиваемому раствору спирта E (425 мг, 1,0 ммоль) в CH_2Cl_2 (8 мл) медленно добавляли тионилхлорид (0,78 мл, 10,0 ммоль) при 0°C. Реакционной смеси давали нагреться до 23°C и перемешивали в течение 1 ч. После концентрирования в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате сырой остаток использовали непосредственно на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки из-за нестабильности хлорида F.

2-((1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин ((±)-9). Смесь сырого хлорида F с предыдущей стадии, 4,6-диамино-2-меркаптопиримидина (625 мг, 4,0 ммоль) и K_2CO_3 (552 мг, 4,0 ммоль) в ДМФ (7 мл) перемешивали при 70°C в течение 1 ч. Раствор охлаждали, концентрировали в вакууме и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (25:1 дихлорметан:метанол) получая желаемый продукт (±)-9 (357 мг, 0,65 ммоль, 65% за две стадии) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,49 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,35 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,90 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 5,24 (с, 1H), 5,02 (кв, J = 7,0 Гц, 1H), 4,58 (с, 4H), 4,22 - 4,18 (м, 2H), 4,15 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,91 - 3,87 (м, 2H), 3,78 - 3,75 (м, 2H), 3,69 - 3,63 (м, 4H), 3,56 - 3,53 (м, 2H), 3,37 (с, 3H), 2,50 (с, 3H), 1,81 (д, J = 7,0 Гц, 3H), 1,46 (т, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 170,7, 163,8, 163,2 (2), 153,3, 149,9, 149,1, 127,9, 126,8, 119,4, 114,0, 111,3, 80,6, 71,9, 70,9, 70,7, 70,6, 69,7, 68,9, 64,7, 59,1, 37,7, 22,0, 14,8, 11,6; HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ рассч. для $C_{25}H_{35}N_5O_5S_2H$, 550,2158; найдено 550,2169.

Для схемы 2.

3-Гидрокси-4-метоксибензотиоамид (B). К смеси 3-гидрокси-4-метоксибензонитрила A (3,00 г, 20,11 ммоль) в пиридине (30 мл) и триэтиламине (3 мл) добавляли раствор сульфида аммония (20 мас.% в H_2O, 20,7 мл, 60,3 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 60°C. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Полученный в результате остаток промывали насыщенным солевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4, концентрировали в вакууме и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (3:1 этилацетат:гексаны), получая B (3,13 г, 17,1 ммоль, 85%) в виде желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, Ацетон-d_6) δ 8,77 (ш с, 1H), 8,65 (ш с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,59 (д, J = 2,5 Гц, 1H), 7,56 (дд, J = 8,5, 2,3 Гц, 1H), 6,94 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 3,88 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, Ацетон-d_6) δ 200,7, 150,5, 145,7, 132,4, 119,5, 114,8, 110,2,55,5.

1-(2-(3-Гидрокси-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-он (C). Смесь тиоамида B (2,75 г, 15,0 ммоль) и 4-бромпентан-2,3-диона (4,03 г, 22,5 ммоль) в этаноле (70 мл) перемешивали в условиях кипячения в течение 4 ч. Полученную в результате смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемое тиазольное промежуточное соединение C (3,79 г, 14,4 ммоль, 96%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ 9,53 (ш с, 1H), 7,34 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,26 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,98 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 3,80 (с, 3H), 2,66 (с, 3H), 2,57 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ 195,2, 162,5, 150,1, 148,5, 147,1, 142,7, 125,6, 118,2, 112,9, 112,5, 55,9, 29,4, 13,2.

N-(2-(5-(4-Ацетил-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метансульфонамид (D). К раствору тиазольного промежуточного соединения C (1,58 г, 6,0 ммоль) в ДМФ (35 мл) добавляли Cs_2CO_3 (3,13 г, 9,6 ммоль) и N-(2-бромэтил)метансульфонамид (2,18 г, 10,8 ммоль). Смесь перемешивали в течение 72 ч при 50°C. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным солевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным Na_2SO_4, концентрировали в вакууме и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (3:2 этилацетат: гексаны), получая желаемый кетон D (1,89 г, 4,9 ммоль, 82%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,00 (с, 1H), 7,51 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,46 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,92 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 4,25 - 4,20 (м, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,60 - 3,55 (м, 2H), 3,03 (с, 3H), 2,76 (с, 3H), 2,70 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 195,8,

162,5, 151,5, 148,9, 147,8, 143,1, 126,4, 121,1, 112,4, 111,7, 69,1, 55,9, 42,7, 40,6, 29,4, 13,4.

(S)-N-(2-(5-(4-(1-Гидроксиэтил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метан-сульфонамид (E). К перемешиваемому раствору (R)-(+)-2-метил-CBS-оксазаборолидина (6,7 мл 1,0М раствора в толуоле, 6,7 ммоль) в ТГФ (26 мл) при -78°C в Ar добавляли комплекс боран-тетрагидрофуран (4,4 мл 1,0М раствор в ТГФ, 4,4 ммоль), после чего раствор D (284 мг, 0,74 ммоль) в ТГФ (14 мл). После завершения добавления D раствор используя поршневой насос в течение 6 ч, реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 20 мин при -78°C. Добавляли H_2O (10 мл) и MeOH (5 мл) и смеси was давали нагреться до комнатной температуры. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным солевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным Na_2SO_4, концентрировали в вакууме и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию дважды на силикагеле с 3:2 этилацетат:гексаны и 40:1 дихлорметан:метанол как систему промывания, отдельно получая спирт E (221 мг 0,57 ммоль, 77%, э.и. 96%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, Ацетон-d_6) δ 7,57 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,46 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,05 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,26 (ш с, 1H), 5,02 - 4,95 (м, 1H), 4,21 (т, J = 5,5 Гц, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,57 (дт, J = 5,5, 5,5 Гц, 2H), 3,04 (с, 3H), 2,48 (с, 3H), 1,50 (д, J = 6,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, Ацетон-d_6) δ 162,9, 156,1, 151,3, 148,4, 127,1, 126,8, 119,7, 112,1, 111,4, 68,6, 64,1, 55,3, 42,6, 39,6, 23,0, 10,0.

(S)-1-(2-(4-Метокси-3-(2-(метилсульфонамидо)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил 2,2,2-трифторацетат (F). К перемешиваемому раствору спирта E (221 мг, 0,57 ммоль) в CH_2Cl_2 (13 мл) медленно добавляли трифторуксусный ангидрид (0,66 мл, 2,9 ммоль) при 0°C. После перемешивания при 0°C в течение 30 мин реакционной смеси давали нагреться до 23°C и перемешивали в течение дополнительных 30 мин перед остановкой. После концентрирования в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате сырой остаток использовали непосредственно на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки из-за нестабильности желаемого трифторацетата F.

(R)-N-(2-(5-(4-(1-((4,6-Диаминопиримидин-2-ил)тио)этил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метансульфонамид (10R) и (S)-N-(2-(5-(4-(1-((4,6-диаминопиримидин-2-ил)тио)этил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метансульфонамид (10S). Смесь сырого хлорида F с предыдущей стадии и 4,6-диамино-2-меркаптопиримидина (112 мг, 0,86 ммоль) в ДМФ (5 мл) перемешивали при 80°C в течение 1 ч. Раствор охлаждали, концентрировали в вакууме и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (25:1 дихлорметан:метанол), получая пару энантиомеров 10R и 10S (178 мг, 0,35 ммоль, э.и. 40% 10R, 61% общий выход за две стадии) в виде белого твердого вещества. Перекристаллизация энантиомеров с системы растворителей MeOH/ацетон давала 10R >93% э.и. ^{1}H ЯМР (500 МГц, Ацетон-d_6) δ 7,55 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,48 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,06 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,26 (ш с, 1H), 5,60 - 5,55 (м, 4H), 5,37 (с, 1H), 5,30 (кв, J = 7,0 Гц, 1H), 4,23 (т, J = 5,5 Гц, 2 H), 3,89 (с, 3H), 3,58 (дт, J = 5,5, 5,5 Гц, 2H), 3,05 (с, 3H), 2,52 (с, 3H), 1,74 (д, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ 168,0, 163,5 (2), 162,9, 153,6, 150,6, 147,8, 126,6, 126,2, 119,5, 112,3, 110,4, 79,0, 67,9, 55,7, 41,9, 36,1, 30,7, 22,2, 11,2; HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ рассч. для $C_{20}H_{26}N_6O_4S_3$ H, 511,1256; найдено 511,1259; 10R $[\alpha]^{19}_D$ = +340,0 (c = 0,12 ацетон) (э.и. = 93%).

Экспрессия и очистка белка. Экспрессию и очистку белка выполняли точно как описано нами.[9] Кратко, мы использовали вариант S74E-C4S-dCK, который представляет собой человеческий белок dCK, где 4 подвергаемых действию растворителя цистеины мутируют в серины (C4S). Мы показали, что C4S мутант создает кристаллы лучшего качества без изменения 3-мерной конформации фермента или его ферментативной активности.[22] Кроме того, фермент содержал мутацию Ser74 глутаминовой кислоты (S74E); эта мутация служит для имитации фосфорилированного состояния данного остатка. Когда мы говорим о dCK в данном сообщении, мы имеем в виду вариант C4S-S74E-dCK. dCK экспрессировали в клетках Escherichia coli BL21 C41(DE3), используя pET-14b вектор; клетки выращивали в среде 2×YT и индуцировали 0,1 мМ IPTG в течение 4 ч при 310 K. Клетки собирали и пеллету лизировали ультразвуком. Лизат осветляли центрифугированием при 30000 об./мин в течение 1 ч при 277 K и супернатант загружали в 5 мл HisTrap никель-аффинную колонку (GE Healthcare). Колонку промывали 300 мл буфера, состоящего из 25 мМ Трис-HCl pH 7,5, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазола. Связанный белок элюировали тем же самым буфером, но содержащим 250 мМ имидазола и дополнительно чистили, используя гель-фильтрацию с использованием S-200 колонки в буфере, состоящем из 25 мМ HEPES pH 7,5, 200 мМ натрия цитрата, 2 мМ ЭДТУ, 3 мМ DTT. Белковые фракции объединяли, концентрировали, делили на аликвоты, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при 193 K до использования.

Кинетический анализ. Активность фосфорилирования о dCK определяли, используя спектроскопический NADH-зависимый фермент-спаренный анализ.[2,23] Все измерения были проведены в трех повторах при 310 K в буфере, состоящем из 100 мМ Трис pH 7,5, 200 мМ KCl, 5 мМ MgCl2, 0,5 мМ ЭДТУ, 0,8 мМ фосфоенолпирувата, 0,4 мМ NADH с 50 нМ dCK и 1 мМ АТФ. IC_{50}^{app} и K_i^{app} определяли, как описано нами[9], и все данные были установлены с помощью программного обеспечения KaleidaGraph.

IC_{50} определения. Выполняли на CCRF-CEM клетках острого лимфобластного лейкоза, как описано ранее.[8,9]

Исследования PET. Исследования PET, чтобы определить % ингибирования активности dCK in vivo, выполняли, как описано ранее.[8,9]

Анализы по человеческой микросомальной стабильности. Данные анализы выполняли с помощью Cyprotex (Watertown, MA) в соответствии со стандартными операционными протоколами.

Фармакокинетика в плазме соединений 8 и 10 у мышей. Данные измерения выполняли, как описано ранее.[8,9] Кратко, C57B1/6 самок мышей обрабатывали ингибиторами dCK путем внутрибрюшинной инъекции. Лекарственные средства вводили в 50% полиэтиленгликоле (ПЭГ 400)/50 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Через пять минут после инъекции лекарственного средства цельную кровь (~75 мкл) получали в разные точки времени из ретро-орбитального синуса, используя гематокрит капиллярные пробирки. Образцы центрифугировали на 20000 × g в течение 5 мин и супернатант (5 мкл) переносили в чистую пробирку. Калибровочные стандарты получали методом добавок разных количеств 9 и 10 в 5 мкл супернатанта из плазмы необработанных мышей, чтобы получить конечные концентрации от 0,001 до 100 пмоль/мкл. Образцы и калибровочные стандарты смешивали с 500 мкл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей внутренний стандарт (Ia). Все образцы выпаривали досуха в вакуумной центрифуге. Остаток восстанавливали в 100 мкл ацетонитрил/вода (50/50, об./об.). Образцы (5 мкл) впрыскивали в колонку с обращенной фазой (Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition Eclipse Plus C18, 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм), уравновешенную в воде ацетонитрил/муравьиная кислота, 95/5/0,1 и элюировали (200 мкл/мин) с увеличением концентрации растворителя B (ацетонитрил/муравьиная кислота 100/0,1, об./об.: мин/% ацетонитрила; 0/5, 2/5, 8/80, 9/80, 10/5, 12/5). Поток, выходящий из колонны, направляли на источник электрораспыления ионов (Agilent Jet Stream), подключенный к тройному квадрупольному масс-спектрометру (Agilent 6460 QQQ), работающего в режиме положительных ионов MRM. Ионные переходы для Ia, 9 и 10 являются от 476,2 до 334,5, от 550,2 до 408,2, от 511,1 до 369,1 соответственно. Площади пиков для 9 и 10 нормализовали к площади пика внутреннего стандарта и концентрации в плазме вычисляли используя, стандартные кривые, построенные по калибровочным стандартам, полученным в плазме от необработанных мышей. Приблизительные значения площади под кривой (AUC), времени полувыведения ($T_{1/2}$), максимальной концентрации в плазме (C_{max}) и времени досягаемости максимальной концентрации (T_{max}) рассчитывали, используя Boomer/Multi-Forte PK Функции из Microsoft Excel.[24,25]

Кристаллизация, сбор рентгеновских данных и уточнения. Кристаллы человеческого dCK в комплексе с ингибиторами и UDP выращивали при 285 K, используя способ паровой диффузии висячей капли. Все комплексы dCK-ингибитор получали следующим образом: 1 мкл dCK белка при 10-17 мг/мл в комплексе с 2,5-кратным молярным избытком ингибитора, 2 мМ UDP и 5 мМ $MgCl_2$ смешивали с 1 мкл запасного буферного раствора. Запасной раствор состоял из 0,9-1,5M тринатрия цитрата дегидрата и 25 мМ HEPES pH 7,5. До начала сбора данных кристаллы пропитывали в минеральном масле для криозащиты. Дифракционные данные для dCK в комплексе с соединениями 2-6 собирали на Life Sciences Collaborative Access Team (LS-CAT) канале синхротронного излучения 21-ID-G. Данные для всех других комплексов (соединений 7-10) собирали, используя внутренний рентгеновский источник (Rigaku RU-200, с вращающимся анодом) с R-Axis IV++ детектором пластины изображения. Данные обрабатывали и масштабировали с помощью XDS и XSCALE.[26] Структуры определяли путем молекулярного замещения с MOLREP[27], используя структуру dCK (PDB точка входа 4JLN[9]) в качестве поисковой модели. Уточнения проводили, используя REFMAC[28], и модель строили, используя Coot.[29] Все координаты ингибитора и описания библиотеки генерировали, используя PRODRG сервер.[30] Все наборы данных совершенно удваивались и итерационные уточнения проводили, используя REFMAC с двойными активными опциями. Сбор данных и статистика уточнений приведены в табл. 1. Структурные фигуры получали, используя молекулярную графическую систему PyMOL (v,1,6,0; Schrödinger).

Моделирование. S-изомер в положении-1 и R-изомер в положении-2 генерировались перебрасыванием хиральности углерода линкера, используя Maestro v. 9,1, Schrödinger, LLC 2010. Данную программу также использовали для создания торсионных сканирований вокруг связь, связывающей хиральный углерод линкера и тиазольное кольцо (торсионный угол определяется CAC-CBC-CBB-NAO).

Моделирования уравновешивания выполняли, используя MCPRO 2,0 пакет программного обеспечения[31] с OPLS-AA[17] силовым полем. Белок сольватирован в 30 Å кэп TIP4P молекул воды.[16] Скелет белка и все длины связи с белком были зафиксированы. Углы и деформации кручения в пределах 11 Å центра связанной молекулы могли варьировать. Испытывались все степени свободы связанной молекулы. Уравновешивание начинали с 5×10^6 конфигураций только движением растворителя с последующими 10×10^6 конфигурациями, в которых испытывались белок и связанная молекула, с дополнительным отбором растворителем в каждой десятой конфигурации. Уравновешивания выполняли, используя Metropolis Monte Carlo в NPT совокупности при 1 атм. и 25°C. Для несвязанных структур оптимизации выполняли, используя OPLS-AA. Неявно определенный растворитель смоделировали, используя обобщенный способ Борна/площади поверхности (GB/SA).[19,21] Энергии оценивали, используя PDDG/PM3 способ[32] в пакете BOSS программного обеспечения.[31]

PDB ID коды

Комплекс	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*10R*
PDB коды	4Q18	4Q19	4Q1A	4Q1B	4Q1C	4Q1D	4Q1E	4Q1F

Спектры для соединений 1, 2, 7, 8, 9R, 9S и 10S.

1-(5-(4-(((4-Аминопиримидин-2-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)-2-метилпропан-2-ол (1 = DI-48). ^{1}H ЯМР (500 МГц, Ацетон-d_6) δ 7,99 (д, J = 6,0 Гц, 1H), 7,53 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,45 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,03 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,31 (ш с, 2H), 6,28 (д, J = 5,5 Гц, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,88 (с, 2H), 2,93 (т, J = 7,5 Гц, 2H), 1,73 - 1,64 (м, 2H), 1,32 (с, 6H), 0,99 (т, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, Ацетон-d_6) δ 170,4, 163,8, 163,5, 155,3, 151,5, 149,3, 148,4, 134,7, 126,9, 119,4, 112,2, 111,3, 101,0, 77,7, 69,2, 55,5, 28,3, 28,1, 26,0 (2), 25,2, 13,1; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{28}N_4O_3S_2$ H, 461,1681; найдено 461,1667.

1-(5-(4-(((2,6-Диаминопиримидин-4-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)-2-метилпропан-2-ол (2 = DI-49) ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,40 -7,35 (м, 2H), 7,04 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,21 (с, 2H), 5,99 (с, 2H), 5,67 (с, 1H), 4,60 (с, 1H), 4,39 (с, 2H), 3,82 (с, 3H), 3,76 (с, 2H), 2,83 (т, J = 7,5 Гц, 2H), 1,60 - 1,52 (м, 2H), 1,22 (с, 6H), 0,92 (т, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ 163,8, 163,4, 162,4, 150,8, 148,7, 148,1, 134,8, 126,0, 119,2, 112,4, 110,3, 90,2, 77,0, 68,8, 55,9, 54,9, 27,7, 26,7 (2), 26,1, 24,9, 13,5; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{29}N_5O_3S_2$ H, 476,1790; найдено 476,1798.

2-((1-(2-(3-(2-Фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-пропилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (7 = DI-68). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,55 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,44 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,88 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 5,25 (с, 1H), 5,24 (кв, J = 7,0 Гц, 1H), 4,87 (дд, J = 5,6, 2,8 Гц, 1H), 4,77 (дд, J=5,6, 2,8 Гц, 1H), 4,55 (с, 4H), 4,47 (дд, J = 5,0, 3,5 Гц, 1H), 4,34 (дд, J = 5,0, 3,5 Гц, 1H), 3,90 (с, 3H), 2,98 - 2,79 (м, 2H), 1,81 (д, J = 7,0 Гц, 3H), 1,75 - 1,58 (м, 2H), 1,00 (т, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ 170,8, 163,8, 163,2 (2), 153,0, 150,9, 148,0, 133,0, 127,4, 120,3, 111,7, 111,6, 81,9 (д, J_{CF} = 170,6 Гц), 80,6, 68,4 (д, J_{CF} = 20,6 Гц), 56,1, 37,8, 28,5, 25,3, 22,4, 13,9; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{21}H_{26}FN_5O_2S_2H$, 464,1590; найдено 464,1567.

2-((1-(2-(3-(2-Фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (8 = DI-72). ^{1}H ЯМР (500 МГц, CD_3OD) δ 7,53 (с, 1H), 7,43 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 7,02 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 5,34 - 5,30 (м, 2H), 4,82 - 4,80 (м, 1H), 4,72 - 4,70 (м, 1H), 4,35 - 4,34 (м, 1H), 4,30 - 4,28 (м, 1H), 2,52 (с, 3H), 1,75 (д, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, CD_3OD) δ 170,4, 165,8, 165,2, 154,8, 152,7, 149,7, 128,6, 128,1, 121,5, 113,3, 112,8, 83,8, 82,5, 80,6, 70,1, 70,0, 56,5, 38,4, 22,20, 11,5; HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ рассч. для $C_{19}H_{22}FN_5O_2S_2$ H, 436,1277; найдено 436,1270.

(R)-2-((1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (9R = R-DI-75). $[\alpha]^{21}_D$ = +265,7 (c = 0,22 ацетон) (э.и. = 99%).

(S)-2-((1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (9S = S-DI-75). $[\alpha]^{20}_D$ = -228,6 (c = 0,14 ацетон) (э.и. = 99%).

(S)-N-(2-(5-(4-(1-((4,6-Диаминопиримидин-2-ил)тио)этил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метансульфонамид (10S = S-DI-82). $[\alpha]^{19}_D$ = -536,4 (c = 0,11 ацетон) (э.и. = 99%).

Список литературы для примера 1

1. Eriksson, S.; Munch-Petersen, B.; Johansson, K.; Eklund, H. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. Cell Mol Life Sci 2002, 59, 1327-46.

2. Sabini, E.; Ort, S.; Monnerjahn, C.; Konrad, M.; Lavie, A. Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy. Nat Struct Biol 2003, 10, 513-9.

3. Toy, G.; Austin, W. R.; Liao, H. I.; Cheng, D.; Singh, A.; Campbell, D. O.; Ishikawa, T. O.; Lehmann, L. W.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Herschman, H. R.; Czernin, J.; Witte, O. N.; Radu, C. G. Requirement for deoxycytidine kinase in T and B lymphocyte development. Proc Natl Acad Sci U S A 2010, 107, 5551-6.

4. Austin, W. R.; Armijo, A. L.; Campbell, D. O.; Singh, A. S.; Hsieh, T.; Nathanson, D.; Herschman, H. R.; Phelps, M. E.; Witte, O. N.; Czernin, J.; Radu, C. G. Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. J Exp Med 2012, 209, 2215-28.

5. Choi, O.; Heathcote, D. A.; Ho, K. K.; Muller, P. J.; Ghani, H.; Lam, E. W.; Ashton-Rickardt, P. G.; Rutschmann, S. A deficiency in nucleoside salvage impairs murine lymphocyte development, homeostasis, and survival. J Immunol 2012, 188, 3920-7.

6. Yang, C.; Lee, M.; Hao, J.; Cui, X.; Guo, X.; Smal, C.; Bontemps, F.; Ma, S.; Liu, X.; Engler, D.; Parker, W. B.; Xu, B. Deoxycytidine kinase regulates the G2/M checkpoint through interaction with cyclin-dependent kinase 1 in response to DNA damage. Nucleic Acids Res 2012, 40, 9621-32.

7. Nathanson, D. A.; Armijo, A. L.; Tom, M.; Li, Z.; Dimitrova, E.; Austin, W. R.; Nomme, J.; Campbell, D. O.; Ta, L.; Le, T. M.; Lee, J. T.; Darvish, R.; Gordin, A.; Wei, L.;

Liao, H. I.; Wilks, M.; Martin, C.; Sadeghi, S.; Murphy, J. M.; Boulos, N.; Phelps, M. E.; Faull, K. F.; Herschman, H. R.; Jung, M. E.; Czernin, J.; Lavie, A.; Radu, C. G. Co-targeting of convergent nucleotide biosynthetic pathways for leukemia eradication. J Exp Med 2014, 211, 473-86.

8. Murphy, J. M.; Armijo, A. L.; Nomme, J.; Lee, C. H.; Smith, Q. A.; Li, Z.; Campbell, D. O.; Liao, H. I.; Nathanson, D. A.; Austin, W. R.; Lee, J. T.; Darvish, R.; Wei, L.; Wang, J.; Su, Y.; Damoiseaux, R.; Sadeghi, S.; Phelps, M. E.; Herschman, H. R.; Czernin, J.; Alexandrova, A. N.; Jung, M. E.; Lavie, A.; Radu, C. G. Development of new deoxycytidine kinase inhibitors and noninvasive in vivo evaluation using positron emission tomography. J Med Chem 2013, 56, 6696-708.

9. Nomme, J.; Murphy, J. M.; Su, Y.; Sansone, N. D.; Armijo, A. L.; Olson, S. T.; Radu, C.; Lavie, A. Structural characterization of new deoxycytidine kinase inhibitors rationalizes the affinity-determining moieties of the molecules. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2014, 70, 68-78.

10. Godsey, M. H.; Ort, S.; Sabini, E.; Konrad, M.; Lavie, A. Structural basis for the preference of UTP over ATP in human deoxycytidine kinase: illuminating the role of main-chain reorganization. Biochemistry 2006, 45, 452-61.

11. Sabini, E.; Hazra, S.; Ort, S.; Konrad, M.; Lavie, A. Structural basis for substrate promiscuity of dCK. J Mol Biol 2008, 378, 607-21.

12. Shu, Y. Z.; Johnson, B. M.; Yang, T. J. Role of biotransformation studies in minimizing metabolism-related liabilities in drug discovery. AAPS J 2008, 10, 178-92.

13. Mikhailovskii, D. I.; Mikhailovskaya, V. N. Rearrangement of Acetylenic Keto Alcohols under Meyer-Schuster Reaction Conditions. Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Khim.Khim.T 1987, 30, 29-31.

14. Gudipati, V.; Curran, D. P.; Wilcox, C. S. Solution-phase parallel synthesis with oligoethylene glycol sorting tags. Preparation of all four stereoisomers of the hydroxybutenolide fragment of murisolin and related acetogenins. J Org Chem 2006, 71, 3599-607.

15. Corey, E. J.; Bakshi, R. K.; Shibate, S. Highly enantioselective borane reduction of ketones catalyzed by chiral oxazaborolidines. Mechanism and synthetic implications. J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 5551-5553.

16. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. Journal of Chemical Physics 1983, 79, 926-935.

17. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; TiradoRives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. Journal of the American Chemical Society 1996, 118, 11225-11236.

18. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. Molecular modeling of organic and biomolecular systems using BOSS and MCPRO. Journal of Computational Chemistry 2005, 26, 1689-1700.

19. Jorgensen, W. L.; Ulmschneider, J. P.; Tirado-Rives, J. Free energies of hydration from a generalized Born model and an ALL-atom force field. Journal of Physical Chemistry B 2004, 108, 16264-16270.

20. Repasky, M. P.; Chandrasekhar, J.; Jorgensen, W. L. PDDG/PM3 and PDDG/MNDO: improved semiempirical methods. J Comput Chem 2002, 23, 1601-22.

21. Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. Journal of the American Chemical Society 1990, 112, 6127-6129.

22. Sabini, E.; Hazra, S.; Konrad, M.; Lavie, A. Nonenantioselectivity property of human deoxycytidine kinase explained by structures of the enzyme in complex with L- and D-nucleosides. J Med Chem 2007, 50, 3004-14.

23. Agarwal, K. C.; Miech, R. P.; Parks, R. E., Jr. Guanylate kinases from human erythrocytes, hog brain, and rat liver. Methods Enzymol 1978, 51, 483-90.

24. Bourne, D. W. MULTI-FORTE, a microcomputer program for modelling and simulation of pharmacokinetic data. Comput Methods Programs Biomed 1986, 23, 277-81.

25. Bourne, D. W. BOOMER, a simulation and modeling program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis. Comput Methods Programs Biomed 1989, 29, 191-5.

26. Kabsch, W. Xds. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2010, 66, 125-32.

27. Vagin, A.; Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2010, 66, 22-5.

28. Murshudov, G. N.; Skubak, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2011, 67, 355-67.

29. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2010, 66, 486-501.

30. Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2004, 60, 1355-63.

31. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. Molecular modeling of organic and biomolecular systems using BOSS and MCPRO. J Comput Chem 2005, 26, 1689-700.

32. Repasky, M. P.; Chandrasekhar, J.; Jorgensen, W. L. Improved semiempirical heats of formation through the use of bond and group equivalents. J Comput Chem 2002, 23, 498-510.

2) Пример 2.

Возможность перепрограммирования клеточного метаболизма, отличительный признак рака впервые, давно отмеченный (Warburg et al., 1927) и недавно вновь оцененный, имеет важное значение для прогрессирования опухоли (Hanahan and Weinberg, 2011). В то время как инициированные раком метаболические перепрограммируемые процессы являются перспективными терапевтическими мишенями (Vander Heiden, 2011), существование альтернативы, компенсаторные биосинтетические пути представляет значительную трудность для развития таких терапий. Например, в липидном метаболизме раковые клетки извлекают внеклеточные липиды как альтернативу к энергопотребляющему de novo биосинтезу жирных кислот (Kamphorst et al., 2011). В аминокислотном метаболизме глицин и серин, требуемые для роста опухоли, могут быть получены de novo и также могут извлекаться из внеклеточной среды (Jain et al., 2012; Maddocks et al., 2012).

Нуклеотидный метаболизм также включает избыточные и конвергентные пути биосинтеза. Дезоксирибонуклеотидтрифосфатные (dNTP) пулы, необходимые для репликации и репарации ДНК, могут быть получены за счет de novo пути (DNP) или за счет пути реутилизации нуклеозида (NSP) (фиг. 16A) (Reichard, 1988). DNP использует глюкозу и аминокислоты для создания рибонуклеотиддисфосфатов (NDP), которые превращаются в дезоксирибонуклеотиддифосфаты (dNDP) с помощью рибонуклеотидредуктазы (RNR). Такие же dNDP также могут быть получены с помощью NSP (Reichard, 1988), начиная с внеклеточных дезоксирибонуклеозидов (dN), которые попадают в клетки через специализированные транспортеры. Первые ферментные стадии в цитозольном NSP катализируется двумя киназами: тимидинкиназа 1 (TK1) фосфорилирует тимидин (dT), тогда как дезоксицитидинкиназа (dCK) фосфорилирует дезоксицитидин (dC), дезоксиаденозин (dA) и дезоксигуанозин (dG) (Reichard, 1988). Востребованность данных двух NSP киназ для продуцирования dNTP в нормальных и злокачественных клетках еще предстоит определить. Поскольку dN субстраты для NSP киназ отсутствуют у большинства клеточных культуральных сред, то предполагается, что NSP является необязательной для репликации ДНК (Xu et al., 1995). Однако недавно in vivo полученные результаты подвергли сомнению это предположение. Например, мы сообщали о нарушенном кроветворении у $dCK^{-/-}$ мышей из-за дефицита дЦТФ пула, что в результате приводит к стрессу репликации (RS), S-фазовой блокировке и повреждению ДНК в гематопоэтических клетках-предшественниках (Austin et al., 2012; Toy et al., 2010). Анализы dCK/TK1 дважды нокаутных мышей показали, что NSP-производные синтеза дЦТФ требуются для компенсации ингибирования de novo продуцирования дЦТФ (Austin et al., 2012) (фиг. 16A). Механизм ингибирования DNP включает аллостерическое регулирование RNR-опосредованного восстановления цитидиндифосфата (CDP) до дезоксицитидиндисфосфата (dCDP) за счет dTTP, продуцированного через TK1 из эндогенного dT (Austin et al., 2012) (фиг. 16A).

Продуцирование dNTP за счет NSP может быть терапевтически относящимся к раку. Например, способность раковых клеток переключать свой синтез дЦТФ с DNP на NSP может объяснить, почему dT, преподносимый как дЦТФ-перебрасывающий агент показал ограниченную эффективность в клинических испытаниях (Chiuten et al., 1980; Kufe et al., 1980; Kufe et al., 1981). Если все правильно, и не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, эта гипотеза предполагает, что комбинация dT (для ингибирования DNP, опосредованного продуцирования дЦТФ) вместе с ингибитором dCK (для совместного

продуцирования дЦТФ за счет NSP), будет более эффективной в уничтожении опухолевых клеток, чем только одно лечение самостоятельно. Здесь мы исследуем данную возможность в контексте острого лимфобластного лейкоза (ALL). Мы демонстрируем, что совместно направленное взаимодействие как de novo, так и путей реутилизации для биосинтеза дЦТФ хорошо переносится у мышей и является эффективным в T-ALL и B-ALL моделях. Мы также описываем анализ на основе позитронно-эмиссионной томографии (PET) касательно неинвазивного контроля in vivo фармакологически нацеленного биосинтеза дЦТФ в раковых клетках.

Реутилизация дезоксицитидина через dCK предотвращает dT-индуцированный летальный репликационный стресс в T-ALL клетках. Лечение dT повышает концентрацию цитозольного dTTP, что в результате приводит к аллостерическому ингибированию продуцирования дЦТФ за счет DNP (фиг. 16A) (Reichard, 1988). Соответственно, в CCRF-CEM (CEM) человеческих T-ALL клетках dT увеличил dTTP и снижал дЦТФ в дозо-зависимом способе (фиг. 16B). В начале S-блокировка (фиг. 16C) индуцировалась концентрациями dT всего лишь 50 мкМ, что увеличивало dTTP ~20 раз и снижало дЦТФ ~5 раз (фиг. 16B). Обогащение CEM культур 2,5 мкМ dC полностью предотвращает блокировку dT-индуцированной S-фазы (фиг. 16C). Добавление dC не предотвратило блокировку S-фазы в CEM клетках, обработанных ингибитором RNR гидроксимочевиной, 5-фторурацилом (5-ФУ) или цисплатином (фиг. 16D), указывая, что реутилизация dC играет определенную роль в противодействии блокированию dT-индуцированной S-фазы.

Для изучения роли dCK в предупреждении dT-индуцированной блокировки S-фазы добавлением dC мы получили CEM dCK^{low} клетки (фиг. 16E), используя dCK-нацеленый кшРНК вектор. Понижение dCK уменьшало захват ^{3}H-дезоксицитидина на ~95% (фиг. 16F) и снижало цитозольные уровни дЦТФ на ~30% (фиг. 16G), но не нарушало нормальное развитие клеточного цикла (фиг. 16H). Дополнение клеточных культуральных сред 2,5 мкМ dC восстанавливало дЦТФ пул в dT-обработанных dCK^{wt} клетках до ~55% от их исходного значения, но не имел никакого эффект на dT-индуцированное истощение дЦТФ пула в dCK^{low} клетках (фиг. 16G). Следовательно, добавление dC предотвращало dT-индуцированную блокировку S-фазы только в CEM dCK^{wt} клетках (фиг. 16C), но не в CEM dCK^{low} клетках (фиг. 16H). Соответственно, в присутствии как dT, так и dC, только dCK^{low}, но не dCK^{wt} CEM клетки показывали (i) активацию RS ответного маркера Chk1, фосфорилированного по Ser345 (pChk1) (фиг. 16I), (ii) индуцирование повреждения ДНК, как определено путем активация Chk2, фосфорилированного по Thr68 (pChk2) (фиг. 16I), pH2A.X окрашивание с помощью проточной цитометрии (фиг. 16J), а также кометным анализом (фиг. 16K) и (iii) апоптоз (фиг. 16L). Таким образом, понижающая регуляция экспрессии dCK в CEM клетках аннулировала способность компенсировать dT-опосредованное ингибирование продуцирования дЦТФ за счет DNP, что в результате привело к истощению дЦТФ, заторможенной репликации ДНК, RS, повреждению ДНК и апоптозу.

В T-ALL клетках dT запускает метаболический переключатель на NSP продуцирование дЦТФ и повышающе регулирует dC реутилизацию. Для того чтобы исследовать биохимический механизм, по которому NSP компенсирует dT-опосредованное DNP ингибирование, мы количественно определили вклад каждого дЦТФ пути биосинтеза в как свободную цитозольную дЦТФ, так и дЦТФ, введенную в ДНК. CEM клетки инкубировали в течение 12 ч с [U-^{13}C]-глюкозой, субстратом для DNP, и с [U-^{13}C/^{15}N]-dC, субстратом для NSP (фиг. 17A). Тяжелый изотоп, которым метили виды дЦТФ, детектировали, используя комбинированную жидкостную хроматографию-тандемную масс-спектрометрию в режиме мониторинга нескольких реакций (ЖХ/МС/МС-МРМ). Массовые дополнения между 3 и 8 идентифицировали дЦТФ, полученную из [U-^{13}C]-глюкозы за счет DNP, тогда как массовые дополнения между 11 и 12 идентифицировали дЦТФ, полученную из [U-^{13}C/^{15}N]-dC за счет NSP (фиг. 17A).

В необработанных CEM клетках свободный дЦТФ пул, полученный из dC за счет NSP в течение 12 ч периода введения метки, был в ~5 раз больше, чем свободный дЦТФ пул, происходящих из глюкозы за счет DNP (фиг. 17B). Однако в ~2,5 раза больше дЦТФ, введенного в ДНК, продуцировалось DNP, чем NSP (фиг. 17B). Обработка dT снижала дЦТФ продуцирование из глюкозы за счет DNP как в свободных цитозольных, так и ДНК дЦТФ пулах (фиг. 17B). Более того, dT увеличивал использование NSP-полученного дЦТФ для синтеза ДНК больше чем в 3 раза по сравнению с исходными значениями (фиг. 17B). Данные полученные результаты подтверждают предыдущие наблюдения, что в базисных условиях синтез ДНК главным образом обуславливается DNP-продуцированной дЦТФ (Xu et al., 1995). Соответственно, большой размер NSP-полученного свободного дЦТФ пула в необработанных CEM клетках (фиг. 17B), вероятно, отражает его неэффективное использования для репликации ДНК в базисных условиях. Примечательно, NSP-полученный свободный дЦТФ пул не уменьшался в dT обработанных клетках, даже при том, что использование этого пула для синтеза ДНК значительно увеличилось (фиг. 17B). Эта находка позволяет предположить, что dT повышающе регулирует дЦТФ продуцирование за счет NSP, что согласуется с заметным увеличением активности dCK (фиг. 17C) и захватом dC (фиг. 17D) в dT-обработанных CEM клетках.

In vivo, реутилизация эндогенного dC деблокируют T-ALL клетки из RS индуцированных dT обработкой. Для того чтобы проверить, могут ли полученные результаты от исследований культур клеток (фиг. 16; 17) быть воспроизведены in vivo, подкожные (п.к.) CEM dCK^{wt} и dCK^{low} ксенотрансплантаты

были установлены NOD SCID гамма (NSG) мышам. dT плазмы достиг максимума ~1,5 мМ через два часа после обработки одной dT инъекцией (2 г/кг, внутрибрюшинно) и затем быстро снизился до исходных значений (~10 мкМ) через 8 ч (фиг. 18A). Внутриопухолевый dTTP увеличивался как в dCK^{wt}, так и dCK^{low} опухолях в течение по меньшей мере 4 ч после dT введения (фиг. 18A). В dCK^{wt} опухолях dT индуцировал небольшую и кратковременную повышающую регуляцию pChk1 в точках времени через 2 и 4 ч (фиг. 18B). В противоположность этому более выраженная и устойчивая повышающая регуляция pChk1 была индуцирована обработкой dT в dCK^{low} опухолях (фиг. 18B). Эти полученные результаты позволяют предположить, что dCK требуется для того, чтобы CEM клетки были способны противостоять RS, индуцированному обработкой dT in vivo.

Для того чтобы понять роль dCK в продуцировании и использовании дЦТФ в опухолях от dT обработанных мышей, мы измеряли свободный дЦТФ пул и инкорпорирование NSP-продуцированного дЦТФ в ДНК. В течение 0-4 ч периода времени дЦТФ уменьшился в несколько раз как в CEM dCK^{wt}, так и в dCK^{low} ксенотрансплантатах и затем начал восстанавливаться, так как dT плазмы упал до исходных значений (фиг. 18C). Восстановление внутриопухолевого дЦТФ происходило значительно медленнее в dCK^{low} ксенотрансплантатах, чем в их двойниках дикого типа (фиг. 18C). Для количественной оценки влияний обработки dT на использовании NSP-продуцированного дЦТФ для синтеза ДНК, несущих опухоль мышей обрабатывали dT или носителем в течение 3,5 ч и затем возбуждали импульс [U-$^{13}C/^{15}N$]-меченным dC. Через тридцать минут мышей умерщвляли для измерения инкорпорирования дЦТФ, полученного из меченного dC в опухолевой ДНК с помощью ЖХ/МС/МС-МРМ (фиг. 18D). В опухолях от обработанных носителем мышей в ~2-раза меньше дЦТФ, полученного из [U-$^{13}C/^{15}N$]-меченого dC, было инкорпорировано в ДНК dCK^{low} опухолей, чем в ДНК их dCK^{wt} двойников (фиг. 18E). В dT обработанных мышах, меченное дЦТФ инкорпорирование в ДНК увеличилось в ~3 раза в dCK^{wt} опухолях, но остался неизменным в dCK^{low} ксенотрансплантатах (фиг. 18E). Вместе с характером pChk1 повышающей регуляции, показанным на фиг. 18B, эти полученные результаты свидетельствуют о том, что при обработке dT in vivo активность dCK требуется для поддержания репликации ДНК опухоли, тем самым предотвращая RS индукцию. Кроме того, аналогичные полученным результатам in vitro (фиг. 17B) обработка dT in vivo увеличивает инкорпорирование NSP-продуцированного дЦТФ в ДНК опухоли.

Для того чтобы определить, является ли увеличение в использовании NSP-продуцированного дЦТФ для синтеза ДНК в опухолях от dT обработанных мыши также связанным с повышающей регуляцией NSP, как показано in vitro (фиг. 17, C и D), мы воспользовались преимуществом ^{18}F-L-FAC (1-L-(2' дезокси-2',-^{18}фторарабинофуранозил)цитозин), фторированный dC аналог (Radu et al., 2008; Shu et al., 2010). ^{18}F-L-FAC проходит клеточную мембрану с помощью нуклеозидных транспортеров и накапливается именно в dCK экспрессирующих клетках по фосфорилирование-зависимому механизму (фиг. 18F); dCK-зависимое фосфорилированное ^{18}F-L-FAC удержание у живых животных может быть визуализировано и количественно определено неинвазивно с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET). Как и ожидалось, dCK^{low} опухоли накапливали на ~40% меньше ^{18}F-L-FAC, чем dCK^{wt} опухоли (фиг. 18F). Через четыре часа после обработки dT, накапливание ^{18}F-L-FAC повышалось на ~20% в dCK^{wt} опухолях (фиг. 18G). Накапливание ^{18}F-L-FAC также повышалось в dCK^{low} опухолях (фиг. 18G), вероятно, из-за их остаточной dCK активности. Однако повышающая регуляция NSP в dCK^{low} опухолях была недостаточной для поддержания синтеза ДНК и предотвращения индукции RS, как показано как маркированной, так и устойчивой pChk1 повышающей регуляцией в dCK^{low} опухолях от dT обработанных мышей (фиг. 18B) и низким инкорпорированием в dCK^{low} опухолях меченого стабильным изотопом дЦТФ в ДНК (фиг. 18E).

NSP опосредует T-ALL клеточную резистентность к обработке dT in vivo. Поскольку NSP требуется для предотвращения dT-индуцированного RS в T-ALL клетках в культуре (фиг. 16I) и in vivo (фиг. 18C), мы определили, является ли понижающая регуляция экспрессии dCK синергетичной с обработкой dT, чтобы индуцировать регрессию опухоли у мышей. CEM dCK^{wt} и dCK^{low} п.к. несущих опухоль мышей обрабатывали dT (2 г/кг) дважды в день в течение 6 дней. Продолжительное dT введение блокировало рост опухолей CEM dCK^{low} без влияния на dCK^{wt} ксенотрансплантаты, как показано (i) серийными измерениями секретированной Gaussia люциферазы, которая служила как показатель опухолевой массы в периферической крови (Tannous, 2009) (фиг. 19A) и (ii) измерения конечной точки размеров опухоли (фиг. 19B) и массы (фиг. 19C). Синергизм между обработкой dT и кшРНК-опосредованной dCK понижающей регуляцией предполагает, что фармакологическое dCK ингибирование в сочетании с введением dT может обеспечить новую терапевтическую стратегию в ALL.

Разработка DI-39, малой молекулы, ингибитора dCK с высокой аффинностью, которая занимает сайт связывания субстрата киназы. Для того чтобы изучить, может ли NSP использоваться терапевтически через фармакологическое dCK ингибирование, мы провели скрининг селективных химических библиотек, включающих ~90000 малых молекул. Данный скрининг с высокой пропускной способностью (HTS) идентифицировал DI-0120 (фиг. 20A), ингибитор dCK с IC_{50} 1,4 мкМ в CEM клетках. Последующее исследование взаимосвязи структура-активность (SAR) дали DI-39 (фиг. 20B), проникающий в клетку (фиг. 20C) ведущий кандидат с IC_{50} 5 нМ, почти в 300 раз более низкий, чем тот, что для DI-0120 (фиг. 20D и (Murphy et al., 2013)). Для того чтобы исследовать, как DI-39 ингибирует dCK мы получили 2,1 Å

сокристаллическую структуру, которая показала, что DI-39 занимает нуклеозид-связывающий сайт киназы, а не сайт связывания донора фосфорила нуклеотида (фиг. 20E; табл. 4). Этот способ связывание дает основание предполагать, что DI-39 является высокоспецифическим ингибитором dCK.

Для дальнейшей оценки DI-39 мы измеряли его эффекты на дЦТФ пул CEM клеток. В то время как обработка или DI-39 (1 мкМ), или dT (50 мкМ) понижала дЦТФ на ~30%, комбинация DI-39/dT была синергетической, уменьшая дЦТФ в CEM клетках на ~70% (фиг. 20F). В то время как в присутствии dC ни dT, ни DI-39 сам по себе индуцированный RS или апоптоз в CEM клетках, комбинация DI-39/dT инициировала оба RS, как измерено с помощью pChk1 повышающей регуляции (фиг. 20G) и апоптозом, как измерено с помощью окрашивания аннексином V (фиг. 20H). Следует отметить, что, когда dCK-нулевая лейкозная клеточная линия L1210-10K (Jordheim et al., 2004) была обработана возрастающими концентрациями DI-39 намного выше тех, которые необходимы для ингибирования активности dCK или уничтожения CEM клеток в сочетании с dT, она не индуцировала апоптоз, дополнительно поддерживая селективность DI-39 для dCK (фиг. 20I). Комбинация DI-39/dT также индуцировала RS (фиг. 20J) и апоптоз (фиг. 20K) в четырех других клеточных линиях ALL (Jurkat, MOLT-4, RS4;11, NALM-6), а также в эритролейкозной клеточной линии (TF-1). Таким образом, DI-39 проникает в клетки, ингибирует NSP-зависимое дЦТФ продуцирование и синергизирует с dT, чтобы индуцировать летальные RS в нескольких лейкозных клеточных линиях.

DI-39 ингибирует активность опухоли dCK in vivo и способствует RS в сочетании с dT. Для оценки DI-39 in vivo мы определили его фармакокинетику (PK) в плазме и в опухолевых тканях. Время полувыведения с плазмы DI-39 составляло ~50 мин (фиг. 21A), и обнаруживаемые количества лекарственного средства (~15 нМ) присутствовали в опухолевых тканях через 8 ч после введение одной дозы (фиг. 21B). Для того чтобы соотнести количество DI-39 в плазме и опухоли через 2, 4, 8 и 12 ч после введения лекарственного средства с фармакодинамическим (PD) эффектом DI-39 (т.е. ингибирование активности опухоли dCK), мы провели ^{18}F-FAC PET/CT сканирования несущих CEM опухоли мышей в данных точках времени (фиг. 21C). DI-39 (50 мг/кг, введенные внутрибрюшинно) снижали накопление ^{18}F-FAC в опухолях на ~30% в течение вплоть до 8 ч (фиг. 21D). Этот уровень снижения сравнивали с тем, что получен в dCK нокдаун модели (фиг. 18E). Время восстановления активности опухоли dCK определяли с PET, после введения DI-39, указывает на то, что устойчивое целевое ингибирование может быть получено путем введения DI-39 каждые 12 ч. Следует отметить, что эта информация не может быть получена из обычных измерений PK в плазме (фиг. 21A).

Для дальнейшего исследования эффектов DI-39 на метаболизм опухоли дЦТФ, через 5,5 ч после обработки dT и/или DI-39, несущих CEM опухоль мышей возбуждали импульсами в течение 30 мин с [U-^{13}C/^{15}N]-dC. ЖХ/МС/МС-МРМ использовали для количественного определения инкорпорирования метки в ДНК. Аналогичные к нашим dCK нокдаун результатам (фиг. 18F), DI-39 значительно снижал [U-^{13}C/^{15}N]-dC инкорпорирование в ДНК CEM клеток (фиг. 21E). Кроме того, DI-39/dT комбинация способствовала RS в CEM опухолях, о чем свидетельствовало pChk1 повышающая регуляция (фиг. 21F). В совокупности данные полученные результаты показывают, что (i) DI-39 эффективно ингибирует активность опухоли dCK in vivo в течение вплоть до 12 ч, (ii) комбинация DI-39/dT индуцирует RS в CEM клетках in vivo, и (iii) PET визуализация обеспечивает полезный PD дополнительный биомаркер для DI-39.

Фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP и биосинтез NSP дЦТФ с DI-39 и dT блокирует рост T-ALL ксенотрансплантатов у мышей. Терапевтическая эффективность комбинации DI-39/dT впервые была исследована у мышей, несущих установленные п.к. CEM ксенотрансплантаты. Только комбинированная терапия резко снижала нагрузку опухоли у данных мышей, как показано размерами (фиг. 22A) и массами (фиг. 22B) опухоли в конечной точке. Кроме того, окрашивание TUNEL собранных опухолей показало значительное индуцирование разрывов ДНК только комбинацией DI-39/dT (фиг. 22C). В отличие от полученных результатов, показанных на фиг. 19, обработка dT сама по себе имела маленький, но значительный эффект на размер и массу CEM опухолей (фиг. 22, A и B). Эта разница, вероятно, объясняется небольшим увеличением dT PK с использованием препарата каптизол/ДМСО, использованного для совместного введения DI-39 с dT; DI-39 имеет ограниченную растворимость в водных солевых растворах. Терапевтическая эффективность комбинации DI-39/dT дополнительно подтверждалась в системной T-ALL модели, в которой CEM клетки впрыскивали внутривенно. В системной T-ALL модели обработка dT сама по себе индуцировала ~7-кратное снижение в процентах лейкозных клеток в костном мозге (BM) по сравнению с носителем и DI-39 обработанных группах (фиг. 22D). Эти данные свидетельствуют о том, что BM-резидентные лейкозные клетки являются более восприимчивыми к dT in vivo, чем они находятся в клеточной культуре. Однако комбинация DI-39/dT снижала тяжесть опухоли путем дополнительного 100-кратного по сравнению с dT самим по себе, показывая сильную синергию между двумя терапевтическими агентами (фиг. 22D). Таким образом, фармакологическое совместное направленное взаимодействие как DNP, так и NSP дЦТФ биосинтетических путей является высокоэффективным против CEM лейкозных клеток in vivo.

Комбинированная терапия является эффективной против первичной B-ALL системной модели и имеет минимальное воздействие на нормальный гематопоэтический пул клетки-предшественника. Далее мы оценивали эффективность комбинированной терапии DI-39/dT против краткосрочных культур мы-

шиных BCR-ABL (pl85), $Arf^{-/-}$ пре-B ALL клеток ($p185^{BCR-ABL}/Arf^{-/-}$) (Boulos et al., 2011; Williams et al., 2006). В то время как первичные B-ALL клетки были чувствительны в культуре к комбинации DI-39/dT, они требовали в 4 раза больше, чем dT чем CEM T-ALL клеточная линия для оптимальной индукции апоптоза (фиг. 23A). Этот вывод согласуется с предыдущими клиническими наблюдениями, что B-ALL является менее чувствительными к обработке dT, чем T-ALL (Kufe et al., 1980). Для того чтобы оценить эффективность dT и/или DI-39 в in vivo B-ALL модели, люциферазы светлячка, меченные $p185^{BCR-ABL}/Arf^{-/-}$ клетки инокулировали внутривенно NSG мышам. Через одиннадцать дней после инокуляции визуализация биолюминесценции (BLI) люциферазы светлячка-меченной $p185^{BCR-ABL}/Arf^{-/-}$ ALL-несущих NSG мышей, обработанных носителем или DI-39 (50 мг/кг) показывали существенное системное заболевание с фокальным BM и локализацией селезенки (фиг. 23B). В то время как обработка dT (2 г/кг) значительно снижала BLI сигналы в BM и селезенка, добавление DI-39 имело более явно выраженный эффект, чем dT сам по себе (фиг. 23, B и C). Для подтверждения полученных результатов BLI мы также проанализировали тяжесть лейкоза в BM с помощью проточной цитометрии, используя CD19 (маркер B клетки, который у NSG мышей присутствует только в лейкозных клетках) (фиг. 23D). Обработка dT индуцировала значительное снижение процентного содержания $p185^{BCR-ABL}/Arf^{-/-}$ ALL клеток по сравнению с обработанными носителем мышами (фиг. 23D). Добавление DI-39 в результате приводило к дополнительному ~2-кратному снижению процентного содержания лейкозных клеток по сравнению с dT самим по себе (фиг. 23D). Данные полученные результаты, используя первичные $p185^{BCR-ABL}/Arf^{-/-}$ клетки, показывают, что комбинация DI-39/dT является эффективной против агрессивной in vivo B-ALL модели.

Параллельно с анализом BM резидентных лейкозных клеткок мы также оценивали влияние комбинированной терапии на гематопоэтический пул клетки-предшественника. Мы проанализировали $Lineage^{-}$ $Sca\text{-}1^{+}$ $c\text{-}Kit^{+}$ (LSK) HSC популяцию, а также краткосрочные (ST), долгосрочные (LT) и полипотентные клетки клетки-предшественника (MPP) гематопоэтической клетки-предшественника. За исключением незначительного снижения процентного содержания LSK при обработке dT (фиг. 23E) не было никаких существенных изменений между контрольными и обработанными группами (фиг. 23, E и F; фиг. 25, A и B). Таким образом, комбинированная терапия преимущественно нацеливается на BM-резидентные лейкозные клетки, несмотря на умеренные нормальные гематопоэтические клетки-предшественники. Кроме того, DI-39 сам по себе или в комбинации с dT, при введении дважды/день в течение 7 дней у NSG мышей не влияли на массу тела (фиг. 23G) и не имели никаких обнаруживаемых эффектов на RBC, гемоглобин, тромбоциты или нейтрофилы (фиг. 23H).

Частичное ингибирование dCK в гематопоэтических тканях предотвращает гематологическую токсичность dT и DI-39. Для дальнейшего изучения потенциальной гематологической токсичности комбинированной терапии мы воспользовались преимуществом наших $dCK^{-/-}$ мышей (Austin et al., 2012). Такой подход позволил нам напрямую сравнивать эффекты на гематопоэтическую систему, индуцированные полной потерей функции dCK у $dCK^{-/-}$ мышей с эффектами, индуцированными фармакологически у dCK мышей дикого типа ($dCK^{+/+}$), используя DI-39 и dT. В эритроиднй линии комбинация DI-39/dT индуцировала заметно меньшее повреждение ДНК и генотоксичность у $dCK^{+/+}$ мышей, как измерено с помощью pH2A.X окрашивания (фиг. 24A) и микроядерного анализа соответственно (фиг. 24B), чем только удаление гена dCK у $dCK^{-/-}$ мышей. Данные полученные результаты показывают, что фармакологическое ингибирование активности dCK DI-39 самого или в комбинации с обработкой dT лучше переносится, чем полное удаление ферментной активности dCK путем генной инактивации гена dCK.

Мы демонстрируем здесь требование для функционального пути реутилизации нуклеозида в T-ALL и B-ALL клетках, чтобы предотвратить недостаточность дЦТФ пула, RS и апоптоз после фармакологического ингибирования de novo синтеза дЦТФ. Мы вводим DI-39, новый низкомолекулярный ингибитор dCK; dCK является киназой, необходимой для компенсационного метаболического переключателя, нацеленного dT-опосредованным DNP ингибированием, на NSP-зависимый биосинтез дЦТФ. Мы исследуем, как DI-39 ингибирует dCK путем получения кристаллической структуры с высокой разрешающей способностью комплекса ингибитор-dCK. Мы демонстрируем терапевтическую эффективность совместно направленного взаимодействия как DNP, так и NSP биосинтетических путей дЦТФ, используя in vivo модели T-ALL и B-ALL, без выявляемой токсичности против нормальных гематопоэтических клеток-предшественников. Мы также описываем сопутствующий фармакодинамический PET анализ ферментной активности dCK, что позволяет неинвазивную in vivo визуализацию фармакологических вмешательств направленных на биосинтез дЦТФ.

Селективность комбинированной терапии DI-39/dT для лейкозных клеток по сравнению с нормальными гематопоэтическими клетками-предшественниками. Наша текущая рабочая модель, не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, чтобы объяснить механизм и наблюдаемую селективность комбинированной терапии для лейкозные клетки по сравнению с нормальными гематопоэтическими клетками-предшественниками, схематически изображены на фиг. 24, C и D. В соответствии с данной моделью фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP (используя dT) и NSP (используя DI-39) является высокоэффективным в индуцировании летального RS против T- и B-ALL клеток и имеет минимальное действие на нормальные гематопоэтические клетки. Как показано с помощью ^{18}F-FAC PET визуализации активности dCK (фиг. 21D; 24D), DI-39 индуцировал частичное ингибирование

dCK в нормальных BM клетках по сравнению с полной потерей активности dCK у $dCK^{-/-}$мышей (Austin et al., 2012; Toy et al., 2010). Остаточная активность dCK в BM клетках после обработки DI-39 может быть достаточной, чтобы предотвратить более значительные сокращения, наблюдаемые для дЦТФ пулов гематопоэтических клеток-предшественников у $dCK^{-/-}$ мышей. Эта модель низкой или отсутствующей токсичности из-за частичного ингибирования терапевтической мишени напоминает последнюю работу, в которых гипоморфное подавление ATR было летальным для опухолевых тканей, подвергшихся воздействию онкогенного стресса, но имели лишь минимальную токсичность в отношении нормальных тканей (Bartek et al., 2012; Schoppy et al., 2012). Кроме того, повышенная восприимчивость ALL клеток к сниженному поступлению дЦТФ может отражать присущую неспособность этих лейкозных клеток установить эффективный ответ RS. Дополнительные исследования необходимы для того, чтобы точно определить дефекты в контрольных точках клеточного цикла, которые повышают восприимчивость ALL клеток к RS, индуцированному недостаточностью dNTP, по сравнению с нормальными клетками гематопоэтической клетки-предшественника, мы отмечаем присутствие инактивирующих мутаций TP53 в нескольких исследуемых ALL клеточных линиях. В данном контексте это дает основание предполагать, что в нормальных клетках с диким типом p53 отклонения в dNTP пулах, индуцированные ингибированием de novo синтеза пиримидина с помощью N-(фосфонацетил)-L-аспартата (PALA) создает необратимое повреждение ДНК, достаточное, чтобы активировать p53 и индуцировать экспрессию белков, что обеспечивает защитную блокировку в нескольких контрольных точках клеточного цикла (Hastak et al., 2008). В раковых клетках с дефектами в p53 или в его нижележащих эффекторах существует неспособность блокировать синтез ДНК, когда пиримидиновые dNTP пулы истощаются, что приводит к необратимому повреждению ДНК, что в конечном итоге вызывает апоптоз (Hastak et al., 2008).

Потенциальные клинические последствия. Высокая авидность для dT была предварительно определена как потенциальная метаболическая предрасположенность определенных видов рака, что приводит к клиническим исследованиям с использованием высоких доз dT как потенциальных терапевтических (O'Dwyer et al., 1987). Продолжительные (более 5 дней) инфузии dT показали ответы у интенсивно предварительно обработанных T-ALL и у пациентов с кожной Т-клеточной лимфомой, с побочными эффектами, которые встречались как терпимые, управляемые и обратимые (Chiuten et al., 1980; Kufe et al., 1980; Kufe et al., 1981). Однако терапевтические ответы к dT у этих пациентов были, в общем, ограниченными и преходящими, потенциально отражая способность NSP за счет dCK, чтобы компенсировать дЦТФ-истощающий эффект dT. Поскольку мощные низкомолекулярные ингибиторы dCK были недавно описаны (Murphy et al., 2013; Yu et al., 2010), последующие клинические исследования могут определить может ли антилейкозная активность dT, сообщаемая в T-ALL и у пациентов с подкожной Т клеточной лимфомой, быть значительно улучшена за счет фармакологической блокады пути реутилизации дезоксицитидина.

Сопутствующие диагностики для лечения нацеливающего биосинтетические пути дЦТФ при раке. Данные, представленные здесь, обеспечивают несколько примеров как in vivo, так и in vitro сопутствующих диагностик (или биомаркеров), которые могли бы помочь клинической трансляции комбинированной терапии DI-39/dT. Как пример, прямые оценки временных изменений в опухолевой активности dCK in vivo с PET выступают более полезными, чем традиционные фармакокинетические измерения в плазме для определения оптимального графика для комбинированной терапии DI-39/dT (фиг. 21). Поскольку наши PET анализы для мониторинга активности dCK уже переведены на людей (Schwarzenberg et al., 2011), подходы, аналогичные тем, которые описаны в наших доклинических экспериментах, могут быть использованы в будущих клинических испытаниях неинвазивного мониторинга ингибирования dCK в тканях-мишенях in vivo. Повышающая регуляция уровней pChk1 и pH2A.X лейкозными клетками при обработке DI-39/dT (фиг. 21F) может обеспечить дополнительные фармакодинамические биомаркеры повреждения ДНК, как показано ранее для ингибиторов PARP (Fong et al., 2009). Кроме того, так как эффективность терапии DI-39/dT зависит от способности опухолевых клеток захватывать большие количества dT и преобразовывать его в dTTP, PET визуализации с использованием ^{18}F-FLT (3'-дезокси-3'-фтортимидина), зонд для метаболизма dT (Shields et al., 1998) может позволить идентифицировать опухоли с необычно высокой авидностью для dT. Таким образом, ^{18}F-FLT PET может соответствовать предлагаемому определению прогнозируемого или обогощенного биомаркера (de Bono and Ashworth, 2010) для терапий на основе dT.

Регуляция NSP за счет пути ответа на повреждение ДНК. Наши данные in vitro (фиг. 21C) и in vivo (фиг. 18, E и F) показывают, что в CEM T-ALL клетках обработка dT повышающе регулировала активность NSP. Тогда как повышающая регуляция NSP за счет обработки dT может возникнуть в результате уменьшения отрицательной ответной реакции дЦТФ на активность dCK (Datta et al., 1989), также могут быть вовлечены дополнительные механизмы. Например, активность dCK увеличивается за счет обработки повреждающими ДНК агентами, которые не влияют на продуцирование дЦТФ через DNP (Csapo et al., 2003; Ooi et al., 1996). Кроме того, активация dCK после повреждения ДНК включает фосфорилирование киназы в серине 74 (Yang et al., 2012). Этот серин является частью мотива SQ/TQ, который является типичным сайтом фосфорилирования для ATM и ATR киназ в пути ответа на повреждение ДНК (DDR). В действительности, dCK был идентифицирован как прямая мишень этих киназ (Matsuoka et al.,

2007). Таким образом, после повреждения ДНК, индуцированного высокой дозой dT, и, потенциально, другими генотоксическими терапиями, DDR путь может способствовать повышающей регуляции NSP за счет пост-трансляционной регуляции dCK с целью расширения dNTP пулов и облегчения восстановления ДНК. Если все правильно, эта модель дает логическое обоснование исследованию ингибиторов dCK в комбинации с лучевой терапией и другими генотоксическими терапиями.

Таким образом, наши результаты дают новое понимание нуклеотидного метаболизма лейкозных клеток, а также демонстрируют новую терапевтическую стратегию для преодоления избыточности и адаптивности нуклеотидного метаболизма в ALL и, возможно, в других гематологических злокачественных опухолях, в которых неконтролируемое расширение пула dTTP за счет обработки dT в результате приводит к потенциальной метаболической подверженности. Аналогичные подходы, которые вписываются в концептуальные рамки нацеливающей склонности неонкогена (Luo et al., 2009), могут быть применимы и к другим излишним биосинтетическим путям, которые обеспечивают преимущества для выживания в опухолевых клетках.

Клеточные линии и условия культивирования. Клетки человеческих клеточных линий CCRF-CEM, Jurkat, MOLT-4, RSR4;11 и TF-1 были получены из ATCC. Все клеточные линии поддерживали в 5% FBS в RPMI-1640 и выращивали при 37°C, 20% O_2, и 5% CO_2.

Мыши были разведены и размещены в специальных свободных от патогенов условиях и обрабатывались в соответствии с руководством протокола комитет по научным исследованиям на животных UCLA. $dCK^{-/-}$ были созданы и разведены как ранее описано, и возвратно скрещены с C57BL/6 мышами при n=7 поколений (Austin et al., 2012; Toy et al., 2010). Подобранная по возрасту (5-12 недель) WT и $dCK^{-/-}$ однопометные животные использовали для оценки индукции RS за счет dT в BM миелоидных клетках.

Тимидин, 2'-дезоксицитидин, гидроксимочевина, 5-ФУ и цисплатин были приобретены у Sigma-Aldrich и готовили в ДМСО или воде. Лентивирусные кшРНК конструкты против dCK и ненацеливающий контроль были от Sigma-Aldrich. Для анализов на клеточных культурах ингибиторы dCK ресуспендировали в ДМСО. Иммуноблоттинг выполняли, как описано ранее (Austin et al., 2012). Антитела и реагенты для иммуноблоттинга были приобретены у следующих производителей: Cell Signaling Technology, фосфо-Chk1 Ser345, фосфо-Chk2 Thr68, Chk1, Chk2, антимышиный HRP-конъюгированный IgG, антикроличий HRP-конъюгированный IgG; Sigma-Aldrich, dCK, бета-актин; Abcam, TK1. Связанное антитело детектировали с использованием реагентов для обнаружения иммуноблоттинг хемилюминесценции (Pierce). Выделение и FACS-фенотипирование гематопоэтических стволовых клеток, EryA и миелоида проводили, как описано ранее (Austin et al., 2012). Клетки $p185^{BCR-ABL}/Arf^{-/-}$ были идентифицированы с помощью анти-CD19 (APC) антитела. Для анализа клеточного цикла суммарное содержание ДНК определяли, используя 1 мкг/мл DAPI или 20 мкг/мл пропидиума иодида, содержащего 5 мкг/мл РНКазы A. Окрашивание аннексином V выполняли в соответствии с протоколом производителя (BD Biosciences). Для микроядерного анализа клетки, выделенные из костного мозга, окрашивали следующими антителами от eBioscience: Ter119 PerCP-Cy5,5 (TER-119), CD71 APC (R17217), CD45 PE-Cy7 (30-F11), CD61 PE (2C9.G3), CD11b APC-eFluor780 (M1/70). Клетки окрашивали, промывали и фиксировали раствором Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Клетки потом промывали и окрашивали 1 мкг/мл DAPI в PBS/2% FBS. Все данные проточной цитометрии получали на четырехлазерном LSRII цитометре (BD Biosciences) и анализировали, используя FlowJo (Tree Star).

NOD SCID гамма (NSG) мышам внутрибрюшинно вводили 2 г/кг dT; 75 мкл цельной крови получали через 0, 2, 4 и 8 ч путем пускания крови с ретро-орбитального синуса, используя гематокрит капиллярные пробирки. Цельную кровь сразу центрифугировали на 3000×g в течение 5 мин, чтобы отделить сыворотку; 30 мкл сыворотки смешивали с 1 мл смеси метанол:ацетонитрил (1:9), встряхивали в течение 2 мин, центрифугировали на 14000×g в течение 4 мин при 4°C. Экстракцию повторяли и объединенный супернатант сушили в вакууме центрифугированием. Остаток растворяли в 100 мкл воды, фильтровали и элюировали, используя колонку Waters microBondapak C18 с градиентом подвижной фазы от 2% метанола до 50% метанола в течение 10 мин при скорости потока 1,5 мл/мин. Тимидин был обнаружен по интенсивности оптической плотности (254 нм), и концентрации интерполировали из стандартных кривых.

Для того чтобы определить фармакокинетический профиль DI-39, C57B1/6 самкам мышей дозировали DI-39 путем внутрибрюшинной инъекции в соответствии с протоколом, который был описан ранее (Murphy et al., 2013). Доза препарата включает 10% ДМСО и 40% каптизола (SBE-β-CD, полианионный переменно замещенный сульфобутиловый простой эфир β-циклодекстрина (Stella and He, 2008)) в воде. Примерно 75 мкл цельной крови получали в разные точки времени, начиная с 5 до 360 мин путем пускания крови с ретро-орбитального синуса, используя гематокрит капиллярные пробирки. Приблизительные значения площади под кривой (AUC), почечный клиренс (CL), время полувыведения ($T_{1/2}$), максимальную концентрацию в плазме (C_{max}) и время досягаемости максимальной концентрации (T_{max}) рассчитывали, используя Boomer/Multi-Forte PK функции от Microsoft Excel.

Для исследования опухолевого и плазменного захвата DI-39, используя ЖХ/МС/МС-МРМ, несущим опухоль NSG мышам внутрибрюшинно вводили 50 мг/кг DI-39 за 0, 2, 4, 8 и 12 ч перед умерщвле-

нием. Целые опухоли вырезали, взвешивали и гомогенизировали, используя равного объема 2 мм в диаметре из нержавеющей стали бусинки (Next Advance) в 1 мл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей 0,5 пмоль/мкл внутреннего стандарта DI-70 (2-(((2-(4-метокси-3-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-пропилтиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин, $C_{25}H_{35}N_5O_5S_2$, ММ = 549,2 г/моль, в собственном синтезированном DI-39 аналоге) в гомогенизаторе Bullet Blender (Next Advance). Тканевые гомогенаты оставляли на ночь при 4°C в шейкере и на следующий день центрифугировали на 20000×g в течение 10 мин. Супернатант (700 мкл) переносили в чистую пробирку и упаривали досуха в вакуумной центрифуге. Остаток восстанавливали в 100 мкл смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.). Для измерений плазмы ~100 мкл крови собирали путем пускания крови с ретроорбитального синуса, используя капиллярные пробирки для сбора крови. Образцы центрифугировали на 20000×g в течение 5 мин и 30 мкл супернатанта переносили в чистую пробирку. Образец смешивали с 500 мкл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей внутренний стандарт, и обрабатывали таким же образом, как и опухолевые гомогенаты. Калибровочные стандарты получали методом добавления рабочего исходного раствора DI-39 в опухолевые гомогенаты и плазму от необработанных мышей, получая следующие диапазоны: 0,02-20 пмоль/мкл. Образцы (5 мкл) впрыскивали в колонку с обращенной фазой (Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) Eclipse Plus C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм), уравновешенную смесью вода/ацетонитрил/муравьиная кислота, 95/5/0,1, и элюировали (200 мкл/мин) с увеличением концентрации растворителя B (ацетонитрил/муравьиная кислота, 100/0,1, об./об.: мин/% ацетонитрила; 0/5, 0/5, 2/5, 8/80, 9/80, 10/5, 12/5). Поток, выходящий из колонки, направляли в источник электрораспыления ионов (Agilent Jet Stream), подключенный к тройному квадрупольному масс-спектрометру (Agilent 6460 QQQ), работающему в режиме положительных ионов MRM. Ионные переходы для DI-39 и DI-70 (525,2→383,3 и 550,2→408,2 соответственно) записывали в предварительно оптимизированных условиях. Площади пиков DI-39 нормализовали по внутреннему стандарту и массе опухоли.

Эксперимент с использованием клеток CCRF-CEM, чтобы измерить захват DI-39 в клеточной культуре по аналогичному протоколу, как описано выше. CCRF-CEM клетки культивировали в 5% FBS в RPMI-1640 средах, дополненных 1 мкм DI-39 в течение 10, 30, 40 и 60 мин перед экстракцией клеток. Для некоторых образцов среды с 1 мкм DI-39 были удалено, и клетки промывали три раза в PBS перед добавлением свежих сред без DI-39 в течение 60 мин. Клетки экстрагировали и гомогенизировали в 1 мл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей 0,5 пмоль/мкл того же внутреннего стандарта, как упоминалось ранее. Экстракт клеток оставляли на ночь при 4°C в шейкере и на следующий день центрифугировали на 20000×g в течение 10 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и упаривали досуха в вакуумной центрифуге. Остаток восстанавливали в 100 мкл смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.). DI-39 определяли количественно, как описано выше.

CEM клетки переносили в RPMI с добавлением 5% диализованной FCS содержащей 10 мкм равномерно меченного [U-^{13}C/^{15}N]-дезоксицитидина (Cambridge Isotopes), 2 г/л равномерно меченной [U-^{13}C]-глюкозы (Cambridge Isotopes) и 0, 50 или 250 мкм dT. Для анализа dNTP, клетки экстрагировали в течение ночи при -20°C 75% метанолом. Экстракты затем нагревали в кипящей воде в течение 3 мин, осаждали и супернатанты переносили и сушили в вакууме центрифугированием. Для анализа ДНК клетки собирали и геномную ДНК экстрагировали, используя Quick-gДНК MiniPrep набор (Zymo Research). Геномную ДНК затем расщепляли до нуклеозидов, используя набор ДНК Degradase Plus (Zymo Research).

Для исследований in vivo несущим опухоль мышам вводили 200 мкл 2,5 мМ [U-^{13}C/^{15}N]-дезоксицитидина за 30 мин до умерщвления. Опухоли собирали, механически расщепляли на отдельные клетки и получали клеточные индексы. Экстракцию ДНК проводили, как описано выше.

Образцы гидролиза ДНК разбавляли 1/1 растворителем A (вода/муравьиная кислота, 100/0,2, об./об.) и анализировали, используя модифицированную версию ранее описанного способа (Cohen et al., 2009) в котором аликвоты раствора (10 мкл) впрыскивали в графитовую колонку с пористым углем (Thermo Hypercarb, 100 × 2,11 мМ, размер частиц 3 мкм), уравновешенную растворителем A, и элюировали (300 мкл/мин) с увеличением концентрации растворителя B (ацетонитрил/мин/% B; 0/0, 6/60, 6,1/100, 9/100, 9,1/0, 10/0). Поток, выходящий из колонки, направляли в поток Agilent Jet, связанный с Agilent 6460 QQQ, работающим в режиме положительных ионов MRM. После реализации изобретения контроля времени удерживания, используя аутентичные стандарты, площади пиков MH^+→ионные переходы фрагмента для изотопомеров dC (M_0, 228,1→112,1; M_1, 229,1→112,1; M_2, 230,1→112,1; M_3, 231,1→112,1; M_4, 232,1→112,1; M_5, 233,1→112,1; M_6, 234,1→113,1; M_7, 235,1→114,1; M_8, 236,1→115,1; 236,1→115,1; M_{11}, 239,1→118,1; и M_{12}, 240,1→119,1) регистрировали, используя программное обеспечение, поставляемое производителем прибора (Agilent MassHunter), и нормализовали на число клеток. Детектировали изотопомеры dC M_3 через M_8 для DNP и M_{11} через M_{12} для NSP и использовали для анализа данных.

Для анализа свободного dNTP использовали модифицированную версию того же ранее описанного способа (Cohen et al., 2009), в котором высушенные образцы снова растворяли в растворителе C (100 мкл, 5 мМ гексиламин, 0,5% мМ диэтиламин, pH 10,0) и аликвоты (10 мкл) впрыскивали в графитовую ко-

лонку с пористым углем (Thermo Hypercarb, 150 × 2,1 мМ, размер частиц 3 мкм), уравновешенную растворителем C и элюировали (150 мкл/мин) с увеличением концентрации растворителя D (ацетонитрил/мин/% D; 0/0, 5/0, 25/40, 25,1/100, 30/100, 30,1/0, 40/0). Поток, выходящий из колонки, направляли в тот самый инструмент, описанный выше, который работает в режиме отрицательных ионов. После реализации изобретения контроля времени удерживания, используя аутентичные стандарты, интенсивности предварительно выбранных $(M-H)^-$→ионных переходов фрагмента для различных дЦТФ изотопомеров (M_0, 466,0→159,0; M_1, 467,0→159,0; M_2, 468,0→159,0; M_3, 469,0→159,0; M_4, 470,0→159,0; M_5, 471,0→159,0; M_6, 472,0→159,0; M_7, 473,0→159,0; M_8, 474,0→159,0; M_{10}, 478,0→159,0; M_{11}, 479,0→159,0; и M_{12}, 478,→159,0) регистрировали, снова используя программное обеспечение, поставляемое производителем прибора (Agilent MassHunter), и нормализовали на число клеток. Детектировали изотопомеры дЦТФ M_5 через M_8 для DNP и M_{12} для NSP и использовали для анализа данных. Изотопомеры M_3 и M_4 не детектировали.

Измерения внутриклеточного dNTP пула проводили, как описано ранее (Austin et al., 2012).

Кометный анализ выполняли в соответствии с протоколом набора реагентов Trevigen CometAssay в щелочных условиях. Для количественного определения четыре случайные секции каждого слайда, содержащего >100 клетки, были изображены, и момент хвоста по Оливе получали, используя программное обеспечение TriTek Cometscore.

Ген, кодирующий гуманизированную секретированную Gaussia люциферазу (sGluc), pCMV-GLuc-1 (Nanolight Technology), субклонировали в MSCV-IRES-GFP ретровирусный вектор. Pheonix-Ampho клетки трансфицировали с генерированным вектором, используя реагент трансфекции липофектамин (Invitrogen, Grand Island, NY). Через 48 ч после трансфекции вирус собирали и использовали для трансдукции CEM dCK^{wt} и CEM dCK^{low} клеток. GFP положительные клетки сортировали с FACSAria II сортировщиком клеток (BD Biosciences).

C4S S74E dCK вариант, используемый для кристаллографических исследований, экспрессировали и чистили, как описано в другом месте (Nomme et al., 2014). Кристаллизацию, сбор рентгеновских данных и уточнения также выполняли, как описано в Nomme et al. Briefly, кристаллы dCK в комплексе с UDP, $MgCl_2$ и 2,5-кратный избыток DI-39 ингибитор были выращены с использованием способа паровой диффузии висячей капли при 12°C. Запасной раствор содержал 0,9-1,5M тринатрия цитрат дегидрат и 25 мМ HEPES (pH 7,5). Дифракционные данные собирали в Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory на Life Sciences-Collaborative Access Team (LS-CAT) с пучком синхротронного излучения 21 ID-G.

Опухоли CEM ксенотрансплантата развивали у 8-12-недельных самок NSG мышей путем имплантации 2×10^6 CEM dCK^{wt}-sGluc-GFP и/или dCK^{low}-sGluc-GFP клеток в 100 мкл равного объема Matrigel (BD Biosciences) и RPMI подкожно в фланги. Рост опухоли контролировали ежедневно путем измерения штангенциркулем ([(длина × ширина^2)/2]) и анализ люциферазы Gaussia (GLuc) в крови (Tannous, 2009). 10 мкл крови собирали через насечку в хвостовой вене и смешивали с 2 мкл 50 мМ ЭДТУ. Один мкл крови смешивали с 99 мкл PBS и переносили в 96-лунковый OptiPlate (Perkin Elmer). 100 мкл 20 мкМ целентеразинового субстрата смешивали и измеряли активность люциферазы, используя микропланшетридер для люминесценции пластины SpectraMax L (Molecular Devices). Модели системной опухоли создавали путем внутривенной инъекции 10^6 CEM dCK^{wt}-sGluc-GFP или dCK^{low}-sGluc-GFP в 100 мкл RPMI. Тимидин (2 г/кг) вводили в физиологическом растворе и DI-39 в смеси 1,4% ДМСО и 40% каптизола (Ligand Pharmaceuticals).

Опухоли из CEM ксенотрансплантата собирали и фиксировали в течение ночи в 10% буферном растворе формалина. Образцы затем заливали парафином и 5 мкм срезы устанавливали на предметные стекла. TUNEL окрашивание выполняли в соответствии с протоколом производителя (Roche Applied Science). Окрашенные слайды впоследствии сканировали на Aperio ScanScope AT (Aperio) и анализ проводили, используя Definiens Tissue Studio 64 (Dual) 3,5 (Definiens AG).

Анализы dCK киназы и захвата выполняли, как описано ранее (Shu et al., 2010).

Всех мышей анестезировали и цельную кровь получали через пункцию сердца. Для определения количества периферической крови образцы собирали в пробирки, содержащие ЭДТУ, и отправляли в UCLA подразделение Lab Animal Medicine для анализа.

PET/CT исследования выполняли как описано ранее (Radu et al., 2008; Shu et al., 2010).

Фармакокинетические исследования DI-39 на мышах выполняли, как описано ранее (Murphy et al., 2013).

Все статистические данные представлены как средние значения биологических повторов со стандартной ошибки среднего (±SEM), если не указано иное. Достоверности значений P рассчитывали из нескольких повторов в пределах набора данных, типичных для нескольких независимых экспериментов, как показано, используя один пример функции t-критерия в GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad).

Список литературы для примера 2

Austin, W.R., A.L. Armijo, D.O. Campbell, A.S. Singh, T. Hsieh, D. Nathanson, H.R. Herschman, M.E. Phelps, O.N. Witte, J. Czernin, and C.G. Radu. 2012. Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. J Exp Med. 209:2215-28.

Bartek, J., M. Mistrik, and J. Bartkova. 2012. Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. Nature structural & molecular biology. 19:5-7.

Boulos, N., H.L. Mulder, C.R. Calabrese, J.B. Morrison, J.E. Rehg, M.V. Relling, C.J. Sherr, and R.T. Williams. 2011. Chemotherapeutic agents circumvent emergence of dasatinib-resistant BCR-ABL kinase mutations in a precise mouse model of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood. 117:3585-95.

Chiuten, D.F., P.H. Wiernik, D.S. Zaharko, and L. Edwards. 1980. Clinical phase I-II and pharmacokinetic study of high-dose thymidine given by continuous intravenous infusion. Cancer Res. 40:818-22.

Cohen, S., M. Megherbi, L.P. Jordheim, I. Lefebvre, C. Perigaud, C. Dumontet, and J. Guitton. 2009. Simultaneous analysis of eight nucleoside triphosphates in cell lines by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 877:3831-40.

Csapo, Z., G. Keszler, G. Safrany, T. Spasokoukotskaja, I. Talianidis, M. Staub, and M. Sasvari-Szekely. 2003. Activation of deoxycytidine kinase by gamma-irradiation and inactivation by hyperosmotic shock in human lymphocytes. Biochem Pharmacol. 65:2031-9.

Datta, N.S., D.S. Shewach, B.S. Mitchell, and I.H. Fox. 1989. Kinetic properties and inhibition of human T lymphoblast deoxycytidine kinase. J Biol Chem. 264:9359-64.

de Bono, J.S., and A. Ashworth. 2010. Translating cancer research into targeted therapeutics. Nature. 467:543-9.

Fong, P.C., D.S. Boss, T.A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, A. Lau, M.J. O'Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S.B. Kaye, J.H. Schellens, and J.S. de Bono. 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. The New England journal of medicine. 361:123-34.

Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 144:646-74.

Hastak, K., R.K. Paul, M.K. Agarwal, V.S. Thakur, A.R. Amin, S. Agrawal, R.M. Sramkoski, J.W. Jacobberger, M.W. Jackson, G.R. Stark, and M.L. Agarwal. 2008. DNA synthesis from unbalanced nucleotide pools causes limited DNA damage that triggers ATR-CHK1-dependent p53 activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:6314-9.

Jain, M., R. Nilsson, S. Sharma, N. Madhusudhan, T. Kitami, A.L. Souza, R. Kafri, M.W. Kirschner, C.B. Clish, and V.K. Mootha. 2012. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. Science. 336:1040-4.

Jordheim, L.P., E. Cros, M.H. Gouy, C.M. Galmarini, S. Peyrottes, J. Mackey, C. Perigaud, and C. Dumontet. 2004. Characterization of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug. Clin Cancer Res. 10:5614-21.

Kamphorst, J.J., J. Fan, W. Lu, E. White, and J.D. Rabinowitz. 2011. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry analysis of fatty acid metabolism. Anal Chem. 83:9114-22.

Kufe, D.W., P. Beardsley, D. Karp, L. Parker, A. Rosowsky, G. Canellos, and E. Frei, 3rd. 1980. High-dose thymidine infusions in patients with leukemia and lymphoma. Blood. 55:580-9.

Kufe, D.W., M.M. Wick, S. Moschella, and P. Major. 1981. Effect of high-dose thymidine infusions in patients with mycosis fungoides. Cancer. 48:1513-6.

Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell. 136:823-37.

Maddocks, O.D., C.R. Berkers, S.M. Mason, L. Zheng, K. Blyth, E. Gottlieb, and K.H. Vousden. 2012. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. Nature. 493:542-6.

Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science. 316:1160-6.

Murphy, J.M., A.L. Armijo, J. Nomme, C.H. Lee, Q.A. Smith, Z. Li, D.O. Campbell, H.I. Liao, D.A. Nathanson, W.R. Austin, J.T. Lee, R. Darvish, L. Wei, J. Wang, Y. Su, R. Damoiseaux, S. Sadeghi, M.E. Phelps, H.R. Herschman, J. Czernin, A.N. Alexandrova, M.E. Jung, A. Lavie, and C.G. Radu. 2013. Development of new deoxycytidine kinase inhibitors and noninvasive in vivo evaluation using positron emission tomography. J Med Chem. 56:6696-708.

Nomme, J., J.M. Murphy, Y. Su, N.D. Sansone, A.L. Armijo, S.T. Olson, C. Radu, and A. Lavie. 2014. Structural characterization of new deoxycytidine kinase inhibitors rationalizes the affinity-determining moieties of the molecules. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 70:68-78.

O'Dwyer, P.J., S.A. King, D.F. Hoth, and B. Leyland-Jones. 1987. Role of thymidine in biochemical modulation: a review. Cancer Res. 47:3911-9.

Ooi, K., T. Ohkubo, M. Higashigawa, H. Kawasaki, and M. Sakurai. 1996. Increased deoxycytidine kinase activity by etoposide in L1210 murine leukemic cells. Biol Pharm Bull. 19:1382-3.

Radu, C.G., C.J. Shu, E. Nair-Gill, S.M. Shelly, J.R. Barrio, N. Satyamurthy, M.E. Phelps, and O.N. Witte. 2008. Molecular imaging of lymphoid organs and immune activation by positron emission tomography with a new [18F]-labeled 2'-deoxycytidine analog. Nat Med. 14:783-8.

Reichard, P. 1988. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. Annu. Rev. Biochem. 57:349-374.

Schoppy, D.W., R.L. Ragland, O. Gilad, N. Shastri, A.A. Peters, M. Murga, O. Fernandez-Capetillo, J.A. Diehl, and E.J. Brown. 2012. Oncogenic stress sensitizes murine cancers to hypomorphic suppression of ATR. The Journal of clinical investigation. 122:241-52.

Schwarzenberg, J., C.G. Radu, M. Benz, B. Fueger, A.Q. Tran, M.E. Phelps, O.N. Witte, N. Satyamurthy, J. Czernin, and C. Schiepers. 2011. Human biodistribution and radiation dosimetry of novel PET probes targeting the deoxyribonucleoside salvage pathway. European journal of nuclear medicine and molecular imaging. 38:711-21.

Shields, A.F., J.R. Grierson, B.M. Dohmen, H.J. Machulla, J.C. Stayanoff, J.M. Lawhorn-Crews, J.E. Obradovich, O. Muzik, and T.J. Mangner. 1998. Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography. Nature medicine. 4:1334-6.

Shu, C.J., D.O. Campbell, J.T. Lee, A.Q. Tran, J.C. Wengrod, O.N. Witte, M.E. Phelps, N. Satyamurthy, J. Czernin, and C.G. Radu. 2010. Novel PET probes specific for deoxycytidine kinase. J Nucl Med. 51:1092-8.

Stella, V.J., and Q. He. 2008. Cyclodextrins. Toxicologic pathology. 36:30-42.

Tannous, B.A. 2009. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. Nat Protoc. 4:582-91.

Toy, G., W.R. Austin, H.I. Liao, D. Cheng, A. Singh, D.O. Campbell, T.O. Ishikawa, L.W. Lehmann, N. Satyamurthy, M.E. Phelps, H.R. Herschman, J. Czernin, O.N. Witte, and C.G. Radu. 2010. Requirement for deoxycytidine kinase in T and B lymphocyte development. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:5551-6.

Vander Heiden, M.G. 2011. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. Nat Rev Drug Discov. 10:671-84.

Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein. 1927. The Metabolism of Tumors in the Body. The Journal of general physiology. 8:519-30.

Williams, R.T., M.F. Roussel, and C.J. Sherr. 2006. Arf gene loss enhances oncogenicity and limits imatinib response in mouse models of Bcr-Abl-induced acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:6688-93.

Xu, Y.Z., P. Huang, and W. Plunkett. 1995. Functional compartmentation of dCTP pools. Preferential utilization of salvaged deoxycytidine for DNA repair in human lymphoblasts. J Biol Chem. 270:631-7.

Yang, C., M. Lee, J. Hao, X. Cui, X. Guo, C. Smal, F. Bontemps, S. Ma, X. Liu, D. Engler, W.B. Parker, and B. Xu. 2012. Deoxycytidine kinase regulates the G2/M checkpoint through interaction with cyclin-dependent kinase 1 in response to DNA damage. Nucleic Acids Res. 40:9621-32.

Yu, X.-C., M. Miranda, Z. Liu, S. Patel, N. Nguyen, K. Carson, Q. Liu, and J.C. Swaffield. 2010. Novel Potent Inhibitors of Deoxycytidine Kinase Identified and Compared by Multiple Assays. J. Biomol. Screening. 15:72-79.

3) Пример 3.

Клетки млекопитающих исходят из двух основных путей для продуцирования и сохранения дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP) для репликации и восстановления ДНК: de novo и путь реутилизации нуклеозида.[1] Путь de novo продуцирует dNTP из глюкозы и аминокислот. Путь реутилизации нуклеозида продуцирует dNTP из предварительно сформированных дезоксирибонуклеозидов, присутствующих во внеклеточном пространстве.[1] Первая ферментативная стадия в цитозольном пути реутилизации дезоксирибонуклеозида катализируется дезоксицитидинкиназой (dCK) и тимидинкиназой 1 (TK1).[2] dCK катализирует 5'-фосфорилирование дезоксицитидина (dC), дезоксигуанозина (dG) и дезоксиаденозина (dA) до их монофосфатных форм, демонстрируя самую высокую аффинность для dC.[3] Монофосфат дезоксирибонуклеотиды впоследствии фосфорилируются до их соответствующих ди- и трифосфатных форм за счет других киназ.[4,5] Мы показали, что dCK и TK1 играют важную роль в кроветворении путем

регуляции биосинтеза dNTP в лимфоидных и эритроидных клетках-предшественниках.[6,7] В дополнение к своей физиологической роли в нуклеотидном метаболизме dCK фосфорилирует несколько клинически важных противовирусных и противоопухолевых пролекарств аналогов нуклеозидов (например, гемцитабин, децитабин, флударабин, цитарабин, клофарабин); фосфорилирование dCK критически необходимо для активации данных пролекарств.[8] Недавно, dCK был вовлечен в регуляцию контрольной точки G2/M в раковых клетках в ответ на повреждение ДНК.[9] Роль dCK в гемопоэзе и раке привела к нашему интересу в разработке низкомолекулярного ингибитора этой киназы. Такие ингибиторы dCK могут представлять новые терапевтические агенты для злокачественных опухолей и иммунных нарушений. Насколько нам известно, о нескольких ингибиторах dCK сообщалось,[10,11,12] и только один[13] продемонстрировал ингибирование активности dCK in vivo.

Позитронно-эмиссионная томография (PET) является неинвазивным методом in vivo визуализации, широко используемым для диагностики, постановки, рестадирования и мониторинга терапии различных заболеваний.[14,15] Тогда как PET с использованием радиоактивной метки 2-^{18}F-фтор-2-дезокси-D-глюкозы (^{18}F-FDG)[16,17] стало важным средством мониторинга диагностики и лечения при раке[18,19,20,21], другое возникающее применение PET касается его использования в обнаружении и разработке лекарственного средства. Таким образом, путем содействия более быстрому и эффективному принятию решения на ранних стадиях процесса разработки/развития лекарственного средства PET может ускорить продвижение перспективных кандидатов и уменьшить неудачи.[22,23,24] Например, PET могут использовать, чтобы продемонстрировать необходимость модифицировать ведущие кандидаты в начале процесса разработки лекарственного средства, предоставляя возможность неинвазивных оценок фармакодинамических (PD) и/или фармакокинетических (PK) свойств лекарственного средства. В конкретном контексте нашей разработки лекарственного средства и программы развития с центром в dCK, PET может играть особенно важную роль, принимая во внимание наличие утвержденных PET биомаркеров для оценки активности dCK in vivo. Данные PET PD биомаркеры активности dCK включают серию субстратов ^{18}F-фторарабинофуранозилцитозиновых аналогов dCK, разработанных нашей группой[25], которые включают ^{18}F-1-(2'-дезокси-2'-фторарабинофуранозил) цитозин (^{18}F-FAC)[26] и ^{18}F-L-1-(2'-дезокси-2'-фторарабинофуранозил) цитозин (^{18}F-L-FAC)[27]. В данном документе мы описываем разработку эффективных ингибиторов dCK и демонстрируем их in vivo эффективность, используя ^{18}F-L-FAC PET как неинвазивный и клинически применимый PD биомаркер.

Идентификация соединения-прототипа 15c. Для идентификации новых низкомолекулярных ингибиторов dCK мы выполняли скрининг с высокой пропускной способностью (HTS) набора выбранных химических библиотек общей сложностью ~90000 малых молекул. Мы провели скрининг библиотеки функционального ингибитора dCK, используя анализ сочетания люциферазы светлячка с рекомбинантный человеческим dCK ферментом.[28] В этом анализе ингибирование dCK предотвращает истощение АТФ за счет dCK, таким образом в результате приводя к более высоким люминесцентным сигналам в положительных лунках. Скрининг дал два хита соединений, 1 и 2, которые были проверены на ингибирование захвата тритиевого дезоксицитидина (^{3}H-dC) с микромолярной эффективностью в L1210 мышиной лейкозной клеточной линии (фиг. 26).

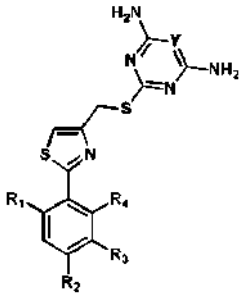
На основании этих результатов исследовали пять коммерчески доступных соединений, содержащих аналогичные структурные остовы; их значения IC_{50} против клеток L1210 определяли путем измерения ингибирования захвата ^{3}H-dC (фиг. 26). Поразительно, соединения 6 и 7 были неактивными, предполагая, что бис-амино функциональность пиримидинового кольца является критической для ингибирования dCK. Основываясь на этих результатах, мы приступили к изучению взаимосвязи структура-активность (SAR), чтобы разработать ведущую структуру, которая может быть дополнительно оптимизирована до соединений с сильной активностью in vivo.

Сначала мы изучили два основных структурных класса соединений, пиримидинов и 1,3,5-триазинов (табл. 5). Две клеточные линии использовали для определения значений IC_{50}: L1210 мышиные лейкозные клетки и CCRF-CEM человеческие Т-лимфобластные клетки острого лейкоза. Почти во всех случаях замещение пиримидинового кольца на 1,3,5-триазиновый мотив уменьшало ингибиторную активность dCK; в некоторых случаях наблюдалось приблизительно 2-разовое уменьшение эффективности. Следовательно, пиримидиновый мотив был использован как предпочтительный остов в будущем. На данной стадии SAR, присутствие фторэтокси боковой цепью в фенильном кольце рассматривалась для возможных целей введения ^{18}F-радиометки. Замещения вокруг фенильного кольца по отношению к положению фторэтокси боковой цепи были также исследованы. Перемещение фторэтокси боковой цепи из параположения в 8a в мета-положение в 9a увеличивало ингибиторную активность приблизительно в 2 раза. Кроме того, было очевидно, что алкокси заместители в пара-положении были лучше, чем алкильные фрагменты, так как соединение 11a имело значительно более низкую активность, чем или метокси 9a или этокси 10a аналоги. Соединение 12a, которое содержит боковую цепь, которая была продлена на один атом углерода с образованием фторпропоксигруппы в мета-положении, дало несколько большую ингибирующую активность, хотя и незначительное увеличение от соединений 9a и 10a. Замещение в ортоположение фенильного кольца, например, в соединениях 13a и 14a, в результате приводило к значительно более низкой ингибиторной активности dCK, приблизительно 10-кратное снижение эффективности

наблюдалось для соединения 14a по сравнению с 9a. Общую схему синтеза для соединений в табл. 5 можно найти во вспомогательной информации.

В то время как присутствие фтора в малой молекуле может в конечном счете позволить синтез ^{18}F-изотополога ингибитора dCK, введение фтора также влияет почти на все физические и ADME (адсорбция, распределение, метаболизм и экскреция) свойства соединения.[29] Способность фтора повышать метаболическую стабильность стала все более очевидной в последние годы.[30] Таким образом, был синтезирован ряд соединений, которые содержали фтор, присоединенный непосредственно к ароматическому кольцу ингибиторов, а не связан с этокси боковой цепью (соединения 16-18, табл. 6). Для каждого соединения в этой серии наборы из трех производных (a-c) были синтезированы; в каждом случае группы в 5-положении тиазола был или метильный, этильный или пропильный заместитель. Для соединений 15a-c фторэтокси боковая цепь сохранялась в мета-положении фенильного кольца, как была метоксигруппа в пара-положении в связи с благоприятным ингибитором, является результатом начального SAR в табл. 5.

Таблица 5. In vitro биологические данные на L1210 и CEM клетках для соединений 8-14



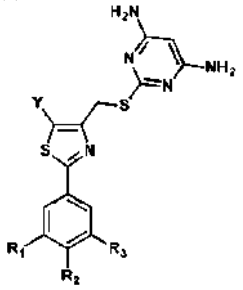
Соединение	R_1	R_2	R_3	R_4	IC_{50} (мкМ) L1210 клетки		IC_{50} (мкМ) CEM клетки	
					a Y = CH	b Y = N	a Y = CH	b Y = N
8	H	OCH_2CH_2F	OCH_3	H	0.808 (±0.406)	1.612 (±0.543)	0.421 (±0.073)	0.534 (±0.012)
9	H	OCH_3	OCH_2CH_2F	H	0.538 (±0.014)	0.528 (±0.015)	0.230 (±0.042)	0.506 (±0.138)
10	H	OCH_2CH_3	OCH_2CH_2F	H	0.513 (±0.160)	1.226 (±0.450)	0.251 (±0.020)	0.512 (±0.409)
11	H	CH_3	OCH_2CH_2F	H	2.381 (±0.042)	3.201 (±0.566)	1.960 (±1.001)	1.922 (±0.573)
12	H	OCH_3	$OCH_2CH_2CH_2F$	H	0.330 (±0.160)	0.603 (±0.140)	0.197 (±0.109)	0.297 (±0.020)
13	OCH_3	H	OCH_2CH_2F	H	1.445 (±0.060)	2.649 (±0.902)	1.041 (±0.084)	0.849 (±0.183)
14	H	OCH_2CH_2F	H	OCH_3	5.469 (±1.336)	H.O.[b]	2.367 (±0.238)	H.O.[b]

[a]Ингибиторная активность, измеренная путем захвата ^{3}H-дезоксицитидина (^{3}H-dC) мышиными L1210 клетками и CCRF-CEM человеческими клетками. Сообщаемые значения являются средними ±SD от по меньшей мере n=2 независимых экспериментов. [b]H.O. - не определяли (соединения не были синтезированы).

Увеличение неполярной функциональности в 5-положении тиазола в результате приводило к возрастанию ингибиторной активности (табл. 6). Значения IC_{50} в CCRF-CEM клетках иллюстрируют ту же тенденцию в эффективности, как наблюдалось в L1210 клетках с одним исключением; комплект 16 показывает небольшое различие между метильным, этильным или пропильным заместителями. Однако для всех соединений против L1210 клеток, пропильный заместитель давал лучшую ингибиторную активность, чем соответствующие метильные производные. Наилучшим примером в L1210 клетках было 12-кратное увеличение активности при сравнении соединения 15c с соединением 15a. Кроме того, сравнения между пропильными заместителями против их соответствующих метильных производных в CCRF-CEM клетках также показали возрастающую ингибиторную тенденцию в активности: 6-кратную (сравнение 17c с 17a) или 3-кратную (сравнение 18c с 18a). Наиболее сильные эффект от модификации в 5-положении тиазольного кольца было изменение, продемонстрированное от 9a в табл. 1-15c в табл. 6, где замещение водорода на пропильный фрагмент в результате приводил к 180-кратному увеличению эффективности в L1210 клетках. Кроме того, удаление фторэтокси боковой цепи (например, серии соединений 16-18) в результате приводило к значительному снижению эффективности в обеих клеточных линиях. Соединение 15c, наиболее эффективное соединение в этой серии, содержит как фторэтокси боковую цепь в мета-положении в фенильном кольце, так и также пропильную группу в 5-положении тиа-

зольного кольца.

Таблица 6. In vitro биологические данные на L1210 и CEM клетках для соединений 15-18

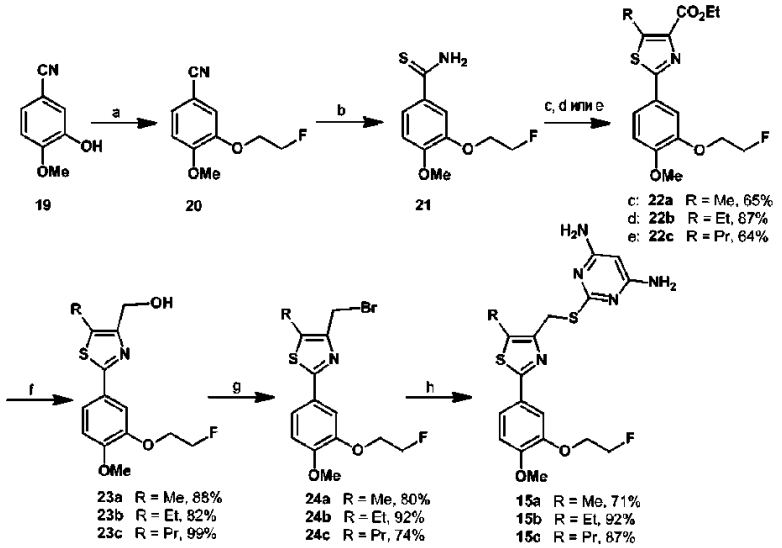


Соединение	R_1	R_2	R_3	IC_{50} (мкМ) L1210 клетки			IC_{50} (мкМ) CEM клетки		
				a Y = Me	b Y = Et	c Y = Pr	a Y = Me	b Y = Et	c Y = Pr
15	H	OCH_3	OCH_2CH_2F	0.035 (±0.015)	0.030 (±0.017)	0.003 (±0.000)	0.018 (±0.012)	0.007 (±0.002)	0.003 (±0.000)
16	F	H	F	0.595 (±0.163)	0.620 (±0.170)	0.385 (±0.262)	0.150 (±0.099)	0.162 (±0.019)	0.173 (±0.157)
17	H	F	H	0.395 (±0.134)	0.265 (±0.163)	0.170 (±0.099)	0.230 (±0.134)	0.083 (±0.013)	0.037 (±0.020)
18	H	H	F	0.255 (±0.021)	0.510 (±0.014)	0.175 (±0.007)	0.092 (±0.045)	0.011 (±0.038)	0.031 (±0.024)

[a]Ингибиторная активность, измеренная путем захвата ^{3}H-дезоксицитидина(^{3}H-dC) мышиными L1210 клетками и CCRF-CEM человеческими клетками. Сообщаемые значения являются средними ±SD от по меньшей мере n = 2 независимых экспериментов.

Соединения 15a-c были синтезированы в шесть стадий (схема 4). Коммерчески доступный 3-гидрокси-4-метоксибензонитрил 19 функционализировали путем алкилирования 1-бром-2-фторэтаном в ДМФ с карбонатом цезия как основой, чтобы получить нитрил 20 с 99% выходом. Подвергание 20 действию водного раствора сульфида аммония в основных условиях давало тиоамид 21 с прекрасным выходом.[31] Циклизация с образованием тиазольного ядра 15a-c достигалась за счет конденсации тиоамида 21 с соответствующим этил 3-бром-2-оксоалканоатом[32] в кипящем этаноле.[33] Восстановление полученных в результате соединений диизобутилалюмогидридом давало соответствующие спирты 23a-c с 88-99% выходом. Спирты 23a-c превращали в соответствующие бромиды 24a-c в мягких условиях[34] с 74-80% выходом. В конечном счете, нуклеофильное замещение бромида 4,6-диамино-2-меркаптопиримидином[35] давало желаемые продукты 15a-c с 71-87% выходом.

Схема 4. Синтез соединений 15a-c[a]



[a]Реагенты и условия: (a) 1-бром-2-фторэтан, Cs_2CO_3, ДМФ, 99%; (b) $(NH_4)_2S$ (20% в H_2O), пиридин, Et_3N, количественное; (c) этил 3-бром-2-оксобутаноат, EtOH; (d) этил 3-бром-2-оксопентаноат, EtOH; (e) этил 3-бром-2-оксогексаноат, EtOH; (f) DIBAL-H, CH_2Cl_2; (g) 1,1,1,3,3,3-гексабромацетон, PPh_3, CH_3CN; (h) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин, NaOH, EtOH.

Рентгеновская кристаллическая структура соединения 15a, связанного с человеческим dCK. Рентгеновские кристаллографические исследования соединения 15a предпринимали, чтобы получить информацию о его связывания с dCK. Подробно описанный анализ взаимодействий dCK-ингибитор выполняли для данной серии соединений. Короче говоря, кристаллическая структура комплекса dCK:15a была определена с 1,9 Å разрешающей способностью (фиг. 27). Человеческий dCK, димер из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой ~30 кДа на мономер, может связываться или с АТФ или УТФ как донором фосфорила для катализа; кроме того, dCK может принимать открытую или закрытую конформацию.[36,37,3] В комплексе с 15a фермент принимает открытую конформацию. Мы наблюдали две 15a молекулы в каждом протомере димерного фермента ((15a-I) и (15a-II), фиг. 27A). Обратите внимание, что связывание 15a с dCK не исключает нуклеотидное связывание (фиг. 27A). Параллельная ориентация между 15a-I и 15a-II позволяет для оптимально π-π стекинг взаимодействий между фенилом и тиазольными кольцами каждой молекулы.

В то время как две молекулы 15a связываются в активном сайте, оказывается, что 15a-I образует более ключевые взаимодействия и более короткие расстояния водородных связей, чем у 15a-II (фиг. 27B). Обширная сеть водородной связи, которая существует между пиримидиновым фрагментом 15a-I и остатками E53, Q97 и D133 в сайт связывания dCK нуклеозида, показаны на фиг. 27B. Фиг. 27C иллюстрирует гидрофобный карман, который существует за счет V55, L82 и F96, вокруг метильной группы соединения 15a. Данная фигура демонстрирует, что карман будет принимать большие заместители, объясняя повышенную тенденцию в эффективности, полученной для соединений 15b и 15c.

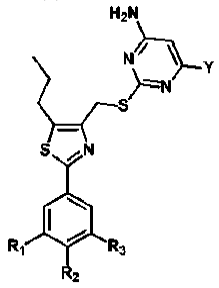
Подход Монте-Карло[38] (MC) на основе компьютерного моделирования, используя способ пертурбации свободной энергии (FEP)[39,40], использовали для дальнейшего исследования ингибиторных эффектов удлинения алкильной цепи в 5-положении тиазола. FEP позволяет рассчитать разность в энергии связывания двух молекул. Пертурбация молекулы A в молекулу B в комплексе с белком [$\Delta G_{белок}(A \rightarrow B)$] и в одном только растворе [$\Delta G_{вода}(A \rightarrow B)$] является частью полного термодинамического цикла (фиг. 3A). Так как сумма всех компонентов в таком цикле должна быть равна нулю, разность энергии связывания может рассчитываться как разность свободных энергий

$$\Delta\Delta G_{связывание}=\Delta G_{связывание}(B)-\Delta G_{связывание}(A)=\Delta G_{белок}(A \rightarrow B)-\Delta G_{вода}(A \rightarrow B)$$

Модели структур 15b и 15c (фиг. 28B) каждая в мономерном комплексе с dCK и в растворе самостоятельно уравновешивали, используя MC. Уравновешенную структуру 15c впоследствии пертурбировали в структуру 15b ("сжимая" пропильную цепь в этил) и наоборот ("наращивая" этильную цепь в пропильную), используя FEP. Данные расчеты выполняли, используя пакет программного обеспечения MCPRO 2,0[41]. Изменения свободной энергии для данных пертурбаций иллюстрируются на фиг. 3C. Усреднение $\Delta\Delta G_{связывание}$, полученное из двух имитаций, указывает на то, что пропильная цепь 15c сообщает на 1,210 ккал/моль больше благоприятной свободной энергии связывания по сравнению с этильной цепью 15b; этот благоприятный эффект обусловлен десольватацией. Изменение свободной энергии при расширении алкильной цепи является неблагоприятным как в комплексе с белком, так и только с водой (положительный ΔG для удлинения цепи, отрицательный ΔG для укорочения цепи); однако величина неблагоприятного ΔG больше в растворителе. Тот факт, что это создает общую благоприятную ΔΔG связывания, позволяет предположить, что пропильная цепь лучше может исключить воду из внутренней полости белка, что позволяет большую ассоциацию между белком и ингибитором.

Основанные на направленности эффективности в табл. 6 и наличие гидрофобного кармана вокруг 5-положения тиазольного кольца 15a, кроме того, соединения в SAR были сделаны с пропильной цепью, введенной в то положение, которое повышает взаимодействия между dCK ферментным карманом и ингибиторами. Атом фтора, находящийся на конце этокси боковой цепи, был замещен на гидроксильную или сульфонамидную группу с целью улучшения свойства растворимости молекулы, а также возможных взаимодействий водородных связей, которые могут существовать в активном сайте. К тому же, поскольку ингибиторная активность в L1210 и CCRF-CEM клетках демонстрировала ту же тенденцию в эффективности, SAR для всех впоследствии синтезированных соединений исследовали только в клетках CCRF-CEM. Результаты приведены в табл. 7.

Табоица 7. In vitro биологические данные в CEM клетках для соединений 25-37[a]



Соединение	R_1	R_2	R_3	Y	IC_{50} (нМ) CEM клетки
25	H	H	OCH_2CH_2OH	NH_2	2.45 (± 0 778)
26	H	F	OCH_2CH_2OH	NH_2	1.07 (± 0 230)
27	F	H	OCH_2CH_2OH	NH_2	2.83 (± 1 628)
28	H	H	$OCH_2CH_2NHSO_2CH_3$	NH_2	11.58 (± 3 353)
29	F	H	$OCH_2CH_2NHSO_2CH_3$	NH_2	8.01 (± 0 230)
30	H	OCH_2CH_2OH	OCH_2CH_2OH	NH_2	2.59 (± 1 146)
31	H	OCH_3	OH	NH_2	18.62[b]
32	H	OCH_3	$OCH_2CH_2CH_2OH$	NH_2	1.55 (± 0 354)
33	H	OCH_3	OCH_2CH_2OH	NH_2	1.15 (± 0 762)
34	H	OCH_3	OCH_2CH_2OH	H	2.90 (± 0 300)
35	H	OCH_3	$OCH_2CH(CH_3)OH$	NH_2	2.85 (± 0 071)
36	H	OCH_3	$OCH_2C(CH_3)_2OH$	NH_2	1.44 (± 0 538)
37	H	OCH_3	$OCH_2CH_2NHSO_2CH_3$	NH_2	4.89 (± 2 014)

[a]Ингибиторная активность, измеренная путем захвата ^{3}H-дезоксицитидина(^{3}H-dC) CCRF-CEM человеческими клетками. Сообщаемые значения являются средними ±SD от по меньшей мере n=2 независимых экспериментов. [b]Значение сообщалось для n = 1

Соединения 25-27 показали отличную (1-2 нМ) эффективность против CCRF-CEM клеток (табл. 7). Замещение в конце цепи гидроксила на метилсульфонамид в результате приводит к уменьшению ингибиторной активности приблизительно в 3 раза (сравнение 27 с 29) или в 5 раз (сравнение 25 с 28). Первоначальный SAR в табл. 5 показывал, что присутствие алкокси заместителя в пара-положении привело к усилению ингибиторной активности; таким образом, метоксигруппу переводили в пара-положение. Как и следовало ожидать, удаление этокси боковой цепи (например, соединение 31) в результате приводило к значительно более низкой ингибиторной активности, подкрепляя данные, наблюдаемые для соединений 16-18 (табл. 6). Присутствие метокси фрагмента в пара-положении в дополнение к гидроксилэтокси боковой цепи в мета-положении создавало соединение 33, которое имеет ингибиторную эффективность 1 нМ. К нашему удивлению, удаление одной из аминогрупп из пиримидинового кольца привело всего лишь к уменьшению в 2,5-раза ингибиторной активности (сравнение 33 с 34). Первоначально мы наблюдали, что удаление обеих аминогрупп из пиримидинового кольца в результате привело к полной потере ингибиторной активности (соединения 6 и 7, фиг. 26); однако, присутствие одной аминогруппы может обеспечить подходящие ключевые взаимодействия водородных связей, чтобы ингибировать фермент. Соединение 32, которое содержит боковую цепь, которая расширяется на один атом углерода, получая гидроксилпропоксигруппу, также было синтезировано. Однако данная модификация в результате приводила к незначительно сниженной ингибиторной активности по сравнению с гидроксилэтоксигруппой. В то время как соединение 33 было эффективным соединением в культуре клеток, присутствие первичной гидроксильной группы в молекуле вызывало затруднения метаболической подверженности как следствие потенциального окисления или глюкуронидирования.[42] Таким образом, соединения 35-37 были синтезированы, чтобы уменьшить возможность метаболической деградации 33. Восемь из данных соединений в табл. 7, чьи значения IC_{50} были ниже, чем 15a, и чьи структурные свойства дают основание предполагать, что они будут иметь лучшую эффективность in vivo, были выбраны для дальнейшего исследования.

Для того чтобы подтвердить то, что значения, основанные на клетках, отражают эффективность соединений, мы также определяли Ki^{app} значения для выбора соединений с использованием кинетических анализов устойчивого состояния. Анализ на основе клеток показал, что соединения 15a было в 6-12 раз (в зависимости от клеточной линии, использованной для анализа) менее эффективным, чем соединение 15c (табл. 6). Соответственно, данные для установившегося режима показали в 6 раз более высокое значение Ki^{app} для соединения 15a (табл. 8). Аналогичным образом, низкую наномолярную IC_{50}, наблюдаемую в CEM клетках для соединений 36 и 37 (табл. 7), воспроизводились в установившихся кинетиках, получен-

ных значений Ki^{app} для данных соединений (табл. 8). Таким образом, мы приходим к выводу, что наш анализ на основе клеток обеспечивает нас относительно точными данными о силе взаимодействий между соединениями и dCK.

Таблица 8. Установившиеся кинетики выбранных ингибиторов dCK

Соединение	Ki app (нМ)	Ошибка (нМ)	R^2
15a*	9.5	2.3	0.974
15c*	1.5	0.3	0.998
36	0.8	0.7	0.982
37	0.5	0.5	0.988

*Данные от Nomme *et al*

Оценка in vivo ингибирования активности dCK с помощью нового анализа PET PD. Аналог нуклеозидного PET зонда ^{18}F-L-FAC представляет собой субстрат с высокой аффинностью для dCK, которые могут быть использованы для неинвазивной оценки ферментной активности dCK in vivo.[27] Схематическое изображение механизма, по которому ^{18}F-L-FAC накапливается в клетках dCK-специфическим способом, показано на фиг. 4A. Мы полагали, что ^{18}F-L-FAC PET может быть использован, чтобы быстро идентифицировать наиболее эффективные ингибиторы dCK на основе их эффективности при ингибировании накопления ^{18}F-меченого dCK субстрата PET меткой в различных тканях. Для анализа in vivo PET PD мы выбрали ингибиторы dCK, которые демонстрировали 1-12 нМ ингибиторную активность в анализе захвата клеточной культурой ^{3}H-dC (табл. 3). Мышей обрабатывали одной дозой (50 мг/кг) данного ингибитора dCK, введенного путем внутрибрюшинной инъекции. Контрольные мыши получали инъекции носителя (40% каптизол в воде). Через четыре часа обработанным мышам внутривенно вводили ^{18}F-L-FAC; через один час после инъекции зонда мыши были обследованы с помощью mPET/CT. Считывание данных PET PD анализа показали снижение накопления ^{18}F-L-FAC в dCK-положительных тканях ингибитора dCK против обработанных носителем мышей. Ранее мы показали, что ^{18}F-L-FAC накапливается dCK-зависимым способом в различных тканях, таких как тимус, селезенка, костный мозг и печень.[27] Накопление в мочевом пузыре является результатом неферментативного почечного клиренса от неразложившиеся зонда. Поскольку воспроизводимость удержания в dCK-зависимой ткани ^{18}F-L-FAC была наиболее соответствующей в печени[27], мы решили дать количественную оценку ^{18}F-L-FAC удержанию в печени для того, чтобы сравнить эффективность in vivo различных ингибиторов dCK. Оптимальные условия для анализа PET PD определяли путем проведения исследования курса эскалации дозы и времени, используя соединение 33.

Результаты сканирований ^{18}F-L-FAC mPET/CT приведены на фиг. 29. Аксиальные PET изображения ^{18}F-L-FAC сканирований печени для мышей, обработанных или носителем или соединениями 15a, 36 или 37, показаны на фиг. 29B. Фиг. 29C иллюстрирует захват ^{18}F-L-FAC в печени мышей, обработанных ингибиторами dCK. Эффективные соединения индуцировали большее снижение захвата ^{18}F-L-FAC по сравнению с обработкой носителем, как результат их большего ингибирования dCK-опосредованного фосфорилирования их ^{18}F-меченного субстрата. Обращаем внимание на снижение приблизительно на 30% ^{18}F-L-FAC сигнала по сравнению с контролем носителя, индуцированное соединениями 28, 29, 36 и 37, что указывает на их высокую in vivo эффективность по сравнению с другими кандидатами в ингибиторы dCK. Кроме того, соединения 30 и 32 показывают снижение приблизительно на 20% в захвате зонда. Соединение 33, эффективные ингибиторы dCK в анализе клеточной культуры (табл. 7), показало эффективность пула in vivo в ^{18}F-L-FAC печени PET анализе, предположительно из-за его плохих PK свойств. Как и предполагалось, замещение гидроксильной группы в конце этокси цепи (например, соединение 33) для метаболически стабильного метилсульфонамида (соединения 28, 29 и 37) или затруднения гидроксильной группы (соединение 36) оказалось выгодным для эффективности in vivo. Соединения 36 и 37 имеют самые низкие значения IC_{50} среди всех эффективных соединений и были выбраны для дальнейшего изучения.

Далее мы определили эффективность соединения 36 при ингибировании активности dCK в опухолевых тканях in vivo. Мышей, несущих CCRF-CEM ксенотрансплантатную опухоль, обрабатывали соединением 36 за четыре часа до инъекции ^{18}F-L-FAC (фиг. 29D). Через час после инъекции ^{18}F-L-FAC мыши были обследованы с помощью тPET/CT. Удерживание ^{18}F-L-FAC в ксенотрансплантатной опухоли от мышей, обработанных соединением 36, снижалось примерно на 30% по сравнению с удерживанием ^{18}F-L-FAC в опухолях от обработанных носителем мышей (фиг. 29D). В дополнение анализа PET фармакокинетики соединения 36 определяли с использованием стандартных аналитических методов, и приблизительные значения приведены на фиг. 30.

Рентгеновские кристаллографические исследования соединения 36 начинали, чтобы получить информацию о его связывании с dCK. Кристаллическая структура комплекса dCK:36 была установлена с 1,94 Å разрешающей способностью (фиг. 31 и табл. 9). Подобно нашим наблюдениям для соединения 15a

(фиг. 27), в случае 36, фермент также принимает открытую конформацию. Мы наблюдали одну молекулу 36 в каждом протомере димерного фермента (фиг. 31A). Это контрастирует с наблюдением двух молекул, связанных с активным сайтом, когда заместитель в 5-положении меньше, чем пропил, присутствующий в 36 (фиг. 27). Обратите внимание, что связывание 36 с dCK не исключает нуклеотидное связывание (фиг. 31A). Специфические взаимодействия dCK:36 показаны на фиг. 31B. Они включают обширную сеть водородных связей между пиримидиновым фрагментом 36 и остатками E53, Q97 и D133 в dCK нуклеозидном сайте связывания, а также несколько гидрофобных взаимодействий.

Сообщается идентификация эффективных низкомолекулярных ингибиторов человеческого dCK, которые демонстрируют in vivo нацеленное ингибирование. Оптимизация ингибиторной активности достигалась за счет расширения алкильной цепи от 5-положения тиазольного кольца, in vivo эффективность была улучшена путем манипулирования этокси боковой цепи, присутствующей в мета-положении фенильного кольца. Полезность PET в качестве мощного инструмента для неинвазивного измерения нацеленного ингибирования и, следовательно, как меры отсутствия нацеленного ингибирования (скорее всего из-за метаболизма субстрата in vivo), также представлены. Хотя основные клинические применения PET являются в первую очередь для центральной нервной системы (ЦНС) и диагностики/терапии на основе онкологии, PET играет все более важную роль в разработке лекарственных средств, принимая во внимание способность этой молекулярной платформы визуализации для решения ключевых проблем, которые включают оценку биораспределения, абсорбции, нацеленной аффинности, связывания с плазмой, метаболизма и дозирования.[43] Здесь мы использовали радиоактивную метку ^{18}F-L-FAC как PET PD биомаркер для сравнения эффективностей in vivo кандидатов в ингибиторы dCK, впервые идентифицированы и охарактеризованы эффективностью в анализе клеточных культур. Кроме того, мы использовали PET для получения оценок in vivo нацеленного ингибирования в CCRF-CEM ксенотрансплантатных мышиных моделях одним из наших наиболее перспективных соединений, 36. Способность другого многообещающего соединения, 37, чтобы вызвать значительный фармакологический ответ против опухолей CCRF-CEM с минимальной токсичностью по отношению к нормальным тканям, оценивалась нашей группой и описана в отдельной публикации. Дальнейшая оптимизация предложений по улучшению свойств PK и растворимости наших наилучших ингибиторов dCK будут рассмотрены в последующих исследованиях. Кроме того, присутствие фтора в ароматическом кольце одного из самых перспективных ингибиторов dCK, 29, делает его доступным для введения ^{18}F радиоактивной метки. Синтез низкомолекулярного ингибитора dCK с ^{18}F радиоактивным изотопом может генерировать позитронно-эмиссионной версию терапевтического кандидата, который может быть обнаружен и количественно определен неинвазивно по всему телу живых индивидуумов за счет PET визуализации. Эта работа будет предметом будущего общения.

Таблица 9. Сбор данных и статистических уточнений

Комплекс	**36 + UDP**
PDB коды	4L5B
Статистика сбора данных	
Источник рентгеновского излучения и детектор	LS-CAT ID-G MARCCD 300
Длина волны (Å)	0.97856
Температура (K)	100
Разрешающая способность[a] (Å)	1.94 (1.94 – 2 05)
Количество рефлексов	
Наблюдаемое	206005
Уникальное	40954
Полнота (%)	99.2 (98.1)
R_{sym} (%)	4.5 (71.8)
Среднее I/s(I)	17.05 (2.05)
Пространственная группа	$P\,4_1$
Элементарная ячейка (Å):	
a = b	68.67
c	120.02
Статистика уточнений	
Уточняющая программа	REFMAC5
Доля удвоений	0.5
Rкрист. (%)	18 8
Rсв. (%)	23 3
Диапазон разрешающей способности (Å)	30 – 1.94
Молекулы белка на ат.ед.	2
Число атомов:	
Белок (белA, белB)	1932, 1925
Ингибитор	32 x 2
UDP	25 x 2
Вода	75
R.m.s. отклонение от идеального:	
Длина связи (Å)	0.011
Углы связи (°)	1.647
Средние B-факторы (Å^2)/цепь	
Белок (белA, белB)	47.1, 47.3
Ингибитор (белA, белB)	45.1, 43.4
UDP (белA, белB)	47.8, 44.7
Молекулы воды	42.9
Карта Рамачандрана (%):	
наиболее предпочтительные области	89.1
Дополнительно дозволенные области	10.5
Обычно дозволенные области	0.5
недозволенные области	0.0

[a]Последняя оболочка в круглых скобках.

Скрининг с высокой пропускной способностью. Рекомбинантный человеческий dCK концентрацией 1 мкМ инкубировали с 10 мкМ лекарственного средства, 10 мкМ dC и 0,5 мкМ АТФ з 50 мМ Трис (pH 7,6), 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ DTT. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 4 ч перед добавлением CellTiter-Glo (Promega): Коротко, 40 мкл dCK фермента распределяли в 384-лунковые планшеты (Greiner, Bahlingen, Germany), используя многоканальный 384 (Thermo, Turku, Finnland) концентрацией 12,5 мкг/мл; соединения добавляли, используя Beckman-Coulter Biomek FX (Beckman Coulter, Brea, CA), оснащенную 500 нл обычным инструментом с иголкой (V&P Scientific, San Diego, CA). Столбцы 1, 2, 23 и 24 получали только ДМСО вместо каких-либо лекарственных средств. Кроме того, ни один dCK не добавляли в столбцы 23 и 24, поскольку эти колонны служили в качестве дополнительного контроля (см. ниже). После 30 мин инкубирования при 37°C, dC и АТФ добавляли до конечных концентраций 10 и 0,5 мкм, соответственно для столбцов 1-22, используя мультипипетку объемом 10 мкл. Для столбцов 23 и 24 использовали следующие контроли: 10 мкл 2,5 мкм раствора АТФ, содержащий следующие дополнительные контроли, добавляли: для лунок A-D23, 1 мкМ дЦТФ, для лунок E-H23 10 мкМ дЦТФ, для лунок I-L23 10 мкМ L-FAC, для лунок F-P23: 10 мкМ FAC, для лунок A-D24: 0,5 мкМ АТФ стандарт, для лунок E-H24: 0,1 мкМ АТФ стандарт, для лунок I-L24 1 мкМ DCK только и для лунок F-P24 10 мкМ УТФ добавляли соответственно. Данные контроли были включены в каждый планшет, чтобы исключить неисправности оборудования. За этим последовало 4-часовой инкубирование при 37°C и добавление 25 мкл клеточного титра glo реагента (Promega, Fitchburg, WI) с помощью мультипипетки с последующим чтением на планшет-ридере Acquest (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Используемые библиотеки были пользовательскими наборами соединений из соединения производителей Asinex (Winston-Salem, NC) и Enamine (Monmouth Jet., NJ). Эти наборы состояли из соединений, широко выбранных за подобием лекарственного средства по правилу пяти Липинского, вращающихся связей и максимального разнообразия с использованием алгоритмов пользовательской кластеризации.

Химия. Общие процедуры. Если не указано иное, реакции проводили в высушенной в сушильном шкафу стеклянной посуде в атмосфере азота, используя коммерчески доступные безводные растворите-

ли. Растворители, используемые для экстракции и хроматографии, не были безводными. 4,6-Диамино-2-меркаптопиримидин получали при высушивании гидрата при динамическом вакууме при 110°C в течение 20 ч. Все другие реагенты, которые получали из коммерческих источников, были реагентами качества и использовали без дополнительной очистки, если не указано иное. Реакционные смеси и хроматографические фракции анализировали, используя тонкослойную хроматографию (ТСХ), используя Merck, предварительно покрытые силикагелем 60 F_{254} стеклянные пластины (250 мкм). Визуализацию осуществляли, используя ультрафиолетовый свет, ванилиновое окрашивание, окрашивание перманганотом, или окрашивание n-анисовым альдегидом. Флеш-колоночную хроматографию выполняли, используя E. Merck силикагель 60 (230-400 меш) с помощью сжатого воздуха. ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектры регистрировали на ARX500 (500 МГц) или Avance500 (500 МГц) спектрометрах. Химические сдвиги регистрировали в миллионных долях (м.д., δ), используя пик остаточного растворителя как стандарт. ДМСО-d_6 (δ 2,50 м.д. для 1H; δ 39,5 м.д. для ^{13}C) использовали как растворитель и эталонные стандарты, если не указано иное. Константы взаимодействия, J, представлены в Герцах (Гц), резонансные характеристики сообщаются с нотациями, как следующие: ш (широкий), с (синглет), д (дублет), т (триплет), кв (квартет) и м (мультиплет). Данные электроспрей масс-спектрометрии собирали с Waters LCT Premier XE времяпролетного устройства для измерения размера частиц контролировали, используя MassLynx 4,1 программное обеспечение. Образцы растворяли в метаноле и вводили, используя непосредственно петлевой инжектор от Waters Acquity UPLC в Multi-Mode источнике ионизации. Чистота всех конечных соединений, как определено, составляла >95%. Аналитический анализ ВЭЖХ выполняли в Knauer Smartline ВЭЖХ системе с Phenomenex колонкой с обращенной фазой Luna (5 мкм, 4,6 × 250 мм) с встроенным УФ детектором Knauer (254 нм). Подвижная фаза: A: 0,1% ТФУ в H_2O, B: 0,1% ТФУ в MeCN. Градиент элюента определяют для каждого описанного соединения в дополнительной информации. Все хроматограммы собирали с помощью GinaStar (Raytest USA, Inc.; Wilmington, NC, USA) аналога цифрового преобразователя и GinaStar программного обеспечения (Raytest USA, Inc.).

Общий способ синтеза соединений 15a-c. 3-(2-Фторэтокси)-4-метоксибензонитрил (20). К раствору 3-гидрокси-4-метоксибензонитрила 19 (3,0 г, 20,1 ммоль) в ДМФ (100 мл) добавляли Cs_2CO_3 (10,5 г, 32,2 ммоль) и 1-бром-2-фторэтан (5,1 г, 40,2 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 50°C. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным солевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным $MgSO_4$ и концентрировали в вакууме, получая сырое вещество 20 (3,91 г, 20,03 ммоль, 99%) в виде твердого вещества кремового цвета. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ: 7,28 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,10 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 6,90 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 4,83 - 4,81 (м, 1H), 4,73 - 4,71 (м, 1H), 4,28 - 4,26 (м, 1H), 4,23 - 4,21 (м, 1H), 3,89 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ: 153,6, 148,1, 127,3, 119,1, 116,5, 111,9, 103,8, 82,3 (д, J_{CF} = 170,5 Гц), 68,7 (д, J_{CF} = 20,3 Гц), 56,1.

3-(2-Фторэтокси)-4-метоксибензотиоамид (21). К смеси 20 (3,86 г, 19,8 ммоль) в пиридине (41 мл) и триэтиламине (3 мл) добавляли раствор сульфида аммония (20 мас.% в H_2O, 13,52 мл, 39,6 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 60°C. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Полученный в результате остаток промывали насыщенным солевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над безводным $MgSO_4$ и концентрировали в вакууме, получая 21 (4,5 г, 19,8 ммоль, количественный) в виде желто-оранжевого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ацетон-d_6) δ: 8,81 (ш с, 1H), 8,74 (ш с, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,72 (дд, 7= 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,00 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 4,79 (дт, J = 48,0, 4,0 Гц, 2H), 4,32 (дт, J = 29,5, 4,0 Гц, 2H), 3,89 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ацетон-d_6) δ: 200,4, 152,9, 147,2, 131,8, 121,5, 113,6, 110,8, 82,7 (д, J_{CF} = 167,3 Гц), 68,5 (д, J_{CF} = 19,6 Гц), 55,4.

Этил 2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-карбоксилат (22a). Смесь тиоамида 21 (1,50 г, 6,5 ммоль) и этил 3-бром-2-оксобутаноата (2,72 г, 13,0 ммоль) в этаноле (32 мл) перемешивали в условиях кипячения в течение 2,5 ч. Полученную в результате смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемое тиазольное промежуточное соединение 22a (1,45 г, 4,3 ммоль, 65%) в виде светло-коричневого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ: 7,40 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,37 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,04 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 4,72 (дт, J = 48,0, 4,0 Гц, 2H), 4,31 - 4,22 (м, 2H), 4,28 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,81 (с, 3H), 2,67 (с, 3H), 1,28 (т, J = 7,0 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, 150 ДМСО-d_6) δ: 162,9, 162,1, 151,4, 148,2, 143,9, 141,9, 125,5, 120,5, 112,6, 110,8, 83,1 (д, J_{CF} = 165,9 Гц), 68,3 (д, J_{CF} = 19,0 Гц), 60,8, 56,0, 14,5, 13,3.

(2-(3-(2-Фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)метанол (23a). К перемешиваемому раствору промежуточного соединения 22a (860 мг, 2,5 ммоль) в CH_2Cl_2 (30 мл), охлажденного до 0°C, медленно добавляли диизобутилалюмогидрид (1,0M в ТГФ, 10 ммоль, 10 мл). Реакционной смеси давали нагреться до 23°C и перемешивали в течение 1 ч. Смесь охлаждали до 0°C и медленно гасили насыщенным водным раствором тартрата натрия-калия. Мутный раствор перемешивали в течение 1 ч при 23°C, пока раствор не стал снова прозрачным. Полученный в результате раствор экстрагировали этилацетатом, промывали насыщенным солевым раствором, сушили над безводным сульфатом магния и концентриро-

вали в вакууме, получая желаемый спирт 23a (654 мг, 2,2 ммоль, 88%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ: 7,39 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,36 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,02 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 5,04 (т, J = 5,5 Гц, 1H), 4,73 (дт, J = 48,0, 3,5 Гц, 2H), 4,46 (д, J = 5,5 Гц, 2H), 4,25 (дт, J = 30,0, 3,5 Гц, 2H), 3,79 (с, 3H), 2,41 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ: 162,7, 153,2, 150,8, 148,2, 129,5, 126,5, 119,8, 112,5, 110,4, 83,1 (д, J_{CF} = 165,9 Гц), 68,4 (д, J_{CF} = 18,5 Гц), 57,3, 55,9, 11,2.

4-(Бромметил)-2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол (24a). К раствору 23a (1,90 г, 6,4 ммоль) в ацетонитриле (30 мл) добавляли PPh_3 (2,5 г, 9,6 ммоль), затем гексабромацетон (1,70 г, 3,2 ммоль) при 23°C. Смесь перемешивали в течение 1 ч при 40°C, когда по ТСХ анализу весь исходный материал израсходовался. Растворитель удаляли в вакууме и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемый бромид 24a (1,84 г, 5,1 ммоль, 80%) в виде светло-коричневого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ: 7,50 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,40 (дд, 7= 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,88 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 4,81 (дт, J = 47,0, 4,0 Гц, 2H), 4,59 (с, 2H), 4,36 (дт, J = 27,5, 4,0 Гц, 2H), 3,90 (с, 3H), 2,46 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$) δ: 164,1, 151,2, 148,1, 148,0, 131,7, 126,4, 120,4, 111,6, 111,5, 82,4 (д, J_{CF} = 169,9 Гц), 68,4 (д, J_{CF} = 20,5 Гц), 55,9, 25,8, 11,4.

2-(((2-(3-(2-Фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин (15a). 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин (336 мг, 2,36 ммоль) и NaOH (94 мг, 2,36 ммоль) перемешивали в этаноле (20 мл) в течение 10 мин при 23°C. К реакционной смеси добавляли раствор бромида 24a (710 мг, 1,97 ммоль) в горячем этаноле (16 мл) и полученную в результате смесь перемешивали в течение 3 ч при 70°C. Раствор охлаждали, концентрировали в вакууме и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (100:5 дихлорметан: метанол), получая желаемый продукт 15a (590 мг, 1,40 ммоль, 71%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ: 7,36 (с, 1H), 7,34 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 7,02 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,09 (ш с, 4H), 5,12 (с, 1H), 4,72 (дт, J = 48,0, 3,5 Гц, 2H), 4,32 (с, 2H), 4,25 (дт, J = 30,5, 3,5 Гц, 2H), 3,78 (с, 3H), 2,43 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) 5: 168,3, 163,9 (2), 163,3, 150,9, 149,5, 148,3, 129,1, 126,4, 119,9, 112,7, 110,5, 83,2 (д, J_{CF} = 165,9 Гц), 79,5, 68,5 (д, J_{CF} = 18,7 Гц), 56,1, 27,9, 11,7; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{18}H_{20}FN_5O_2S_2$ H, 422,1121; найдено 422,1136.

2-(((5-Этил-2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)тиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин (15b). ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ: 7,37 (дд, J = 8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,36 (с, 1H), 7,02 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,13 (ш с, 4H), 5,13 (с, 1H), 4,72 (дт, J = 47,5, 4,0 Гц, 2H), 4,34 (с, 1H), 4,25 (дт, J = 30,5, 4,0 Гц, 2H), 3,79 (с, 3H), 2,87 (кв, J = 7,5 Гц, 2H), 1,17 (т, J = 7,5 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ: 168,2, 163,8 (2), 163,5, 151,0, 148,4, 148,3, 136,9, 126,5, 119,9, 112,7, 110,5, 83,3 (д, J_{CF} = 165,9 Гц), 79,5, 68,5 (д, J_{CF} = 18,8 Гц), 56,1, 28,0, 19,9, 17,1; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{19}H_{22}FN_5O_2S_2$ H, 436,1277; найдено 436,1263.

2-(((2-(3-(2-Фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-пропилтиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин (15c). ^{1}H ЯМР (500 МГц, ацетон-d_6) δ: 7,53 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,46 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,03 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 5,63 (ш с, 4H), 5,38 (с, 1H), 4,80 (дт, J = 48,0, 4,0 Гц, 2H), 4,45 (с, 2H), 4,34 (дт, J = 29,5, 4,0 Гц, 2H), 3,87 (с, 3H), 2,91 (т, J = 7,5 Гц, 1H), 1,66 (кв. т, J = 7,5, 7,5 Гц, 2H), 0,97 (т, J = 7,5 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ацетон-d_6) δ: 169,2, 164,0 (2), 163,9, 163,6, 151,4, 149,0, 148,5, 134,6, 126,9, 119,8, 112,1, 111,1, 82,8 (д, J_{CF} = 167,5 Гц), 79,5, 68,6 (д, J_{CF} = 19,5 Гц), 55,3, 28,1, 25,2, 13,0; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{20}H_{24}FN_5O_2S_2$ H, 450,1434; найдено 450,1432.

1-(5-(4-(((4,6-Диаминопиримидин-2-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)-2-метилпропан-2-ол (36). ^{1}H ЯМР (500 МГц, MeOD) δ: 7,51 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,39 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,00 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 5,48 (с, 1H), 5,32 (с, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,89 (с, 3H), 3,86 (с, 2H), 2,88 (т, J = 7,5 Гц, 2H), 1,67 (кв т, J = 7,5, 7,5 Гц, 2H), 1,33 (с, 6H), 0,98 (т, J = 7,5 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ: 168,8, 165,2, 163,8 (2), 151,2, 148,9, 148,0, 135,4, 126,4, 119,7, 111,8, 110,7, 79,2, 77,0, 69,6, 55,2, 48,4, 27,9, 27,8, 25,0, 24,9, 12,6; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{22}H_{29}N_5O_3S_2$ H, 476,1790; найдено 476,1772.

N-(2-(5-(4-(((4,6-Диаминопиримидин-2-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метансульфонамид (37). ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ: 7,41 (дд, J = 7,5, 2,0 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,25 (т, J = 6,0 Гц, 1H), 7,05 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,13 (ш с, 4H), 5,15 (с, 1H), 4,39 (с, 2H), 4,07 (т, J = 5,5 Гц, 2H), 3,80 (с, 3H), 3,36 (дт, J = 5,5, 5,5 Гц, 2H), 3,15 (д, J = 5,5 Гц, 1H), 2,98 (с, 3H), 2,84 (т, J = 7,5 Гц, 2H), 1,58 (кв т, J = 7,5, 7,5 Гц, 2H), 0,91 (т, J = 7,5 Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d_6) δ: 168,3, 163,9 (2), 163,7, 151,1, 149,1, 148,3, 135,0, 126,5, 119,9, 112,7, 110,6, 79,5, 68,3, 60,2, 42,4, 31,2, 28,2, 28,0, 25,4, 13,9; HRMS-ESI (m/z) $[M + H]^+$ рассч. для $C_{21}H_{28}N_6O_4S_3$ H, 525,1412; найдено 525,1404.

Анализ захвата dCK выполняли в клеточной культуре. Все L1210 и CCRF-CEM клеточные линии культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 5% FCS в 5% CO_2 37°C инкубатора. Для анализов захвата клетки высевали с плотностью 50000 клеток/лунку в Millipore MultiScreen GV 96-лунковых планшетах. 0,25 мкКи ^{3}H-dC (Moravek Biochemicals) добавляли к клеткам одновременно с концентрациями ингибитора dCK при конечном объеме 100 мкл/лунку. Через 1 ч при 37°C, клетки промывали четыре раза охлажденным льдом фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), используя Millipore вакуумный коллектор. Количество включенного зонда измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика с Perkin Elmer MicroBeta.

Экспрессия белка и очистка. Подробности об экспрессии варианта C4S S74E dCK и очистки подробно описаны в Nomme et al.

Кристаллизация, сбор рентгеновских данных и уточнения. Кристаллизацию, сбор данных и определение структуры dCK в комплексе с 15a и 36 выполняли по общей методике, как подробно описано в Nomme et al. Специально для соединения 36 кристаллы dCK в комплексе с UDP, $MgCl_2$ и 2,5-кратный избыток ингибитора 36 выращивали с использованием способа паровой диффузии висячей капли при 12°C. Запасной раствор содержал 0,9-1,5M тринатрия цитрат дегидрата и 25 мМ HEPES (pH 7,5). Дифракционные данные собирали в Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory на Life Sciences-Collaborative Access Team (LS-CAT) с пучком синхротронного излучения 21 ID-G.

Кинетический анализ. Стационарно режимный кинетический анализ и данные выравнивания выполняли, как описано в Nomme et al.

Компьютерное моделирование. Все моделирования выполняли, используя MCPRO 2,0 пакет.[41] Начальные координаты были получены из рентгеновской структуры dCK в комплексе с соединением 15c. Белок сольватировали в воде 30 Å кэп, представленного по классической модели воды TIP4P[44]. Атомы определяемого вещества были представлены силовым полем OPLS-AA[45], которое использовали. Уравновешивания выполняли, используя подхода Монте-Карло (MC) в NPT ансамбле при 25°C и 1 атм. Скелет белка и все длины связи в белке фиксировали; отбирали углы и торсионы в пределах 11 Å от центра связанной молекулы. Все степени свободы соединения ингибитора отбирали во время моделирований уравновешивания. Уравновешивание состояло из 5×10^6 конфигураций отбора проб, в которых были разрешены только движения растворителя, и 10×10^6 последующих конфигураций для комплекса белок-ингибитор и для одного ингибитора в растворе. Уравновешенные системы затем подвергали моделированиям пертурбации свободной энергии (FEP)/MC. Эти моделирования состояли из 14 стадий пертурбации двойной ширины выборки образца. Во время FEP система испытывала 5×10^6 конфигураций уравновешивания растворителя с последующими 10×10^6 конфигурациями полного уравновешивания и 25×10^6 конфигураций сбора данных. Все степени свободы ингибитора были отобраны за исключением тех связей, которые испытывают пертурбацию. Пертурбиновые длины связей систематически варьировали от исходной до конечной длины.

Исследования in vivo MicroPET/CT визуализации. Исследования на животных были одобрены комитетом по научным исследованиям на животных UCLA и проводили в соответствии с руководстами департамента медицины по лабораторным животным при UCLA. Для PET анализа печени C57BL/6 мышам внутрибрюшинно (в.б.) вводили указанные количества ингибитора dCK (ресуспендированного в 40% каптизоле) за 4 ч до внутривенной инъекции 70 мкКи ^{18}F-L-FAC. Для анализа опухолевого ксенотрансплантата NOD scid IL-2 рецептор гамма-цепи нокаута (NSG), несущих подкожную CCRF-CEM ксенотрансплантатную опухоль, вводили 50 мг/кг соединения 36 или носитель. Через четыре часа после того как обработанным мышам внутривенно вводили 70 мкКи ^{18}F-L-FAC. Для всех исследований mPET/CT интервал 1 ч был разрешен через введение зонда и сканирование mPET/CT (Inveon, Siemens Medical Solutions USA Inc.; microCAT, Imtek Inc.). Статические mPET изображения получали для 600s. Изображения анализировали, используя программное обеспечение для визуализации OsiriX версии 3,8.

Фармакокинетические исследования. C57B1/6 самкам мышей 8-недельного возраста вводили разовую дозу указанных соединений (50 мг/кг, в.б.). Образцы крови (приблизительно 70 мкл) собирали через ретро-орбитальное кровотечение в гепаринизированные пробирки через 5, 15, 30, 35, 40, 45 мин, 1, 2, 4 и 6 ч. Образцы крови центрифугировали на 20000 × g в течение 5 мин чтобы отделить плазму. 1 мл ацетонитрила добавляли в 30 мкл плазмы. Супернатант переносили в новые пробирки и выпаривали, используя SpeedVac. Образцы затем ресуспендировали в 50 мкл чистого ДМСО и супернатант переносили в флаконы для образцы ЖХ/МС. Образцы затем прогоняли на Agilent 6460 Triple Quad ЖХ/МС.

Статистический анализ. Все статистические данные, представленные как средние значения биологических повторений со стандартной ошибкой среднего (±SEM), стандартным отклонением (±SD) или коробчатыми диаграммами с максимальными и минимальными шумами. P-значения значимости рассчитывали, используя один образец t тестовой функции Стьюдента в GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad).

PDB ID КОДЫ. Фиг. 27 и 28: dCK + 15a + UDP код: 4JLK. Фиг. 31: dCK + 36 + UDP код: 4L5B

Список литературы для примера 3

1. Reichard, P., Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. Annu. Rev. Biochem. 1988, 57, 349-374.

2. Arner, E. S. J.; Eriksson, S., Mammalian Deoxyribonucleoside Kinases. Pharmac. Ther. 1995, 67, 155-186.

3. Sabini, E.; Hazra, S.; Ort, S.; Konrad, M.; Lavie, A., Structural Basis for Substrate Promiscuity of dCK. J. Mol. Biol. 2008, 378, 607-621.

4. Pasti, C.; Gallois-Montbrun, S.; Munier-Lehmann, H.; Vernon, M.; Gilles, A. M.; Deville-Bonne, D., Reaction of Human UMP-CMP Kinase with Natural and Analog Substrates. Eur. J. Biochem. 2003, 270, 1784-1790.

5. Krishnan, P.; Gullen, E. A.; Lam, W.; Dutschman, G. E.; Grill, S. P.; Cheng, Y. C., Novel Role of 3-Phosphoglycerate Kinase, a Glycolytic Enzyme, in the Activation of L-Nucleoside Analogs, a new class of Anticancer and Antiviral Agents. J. Biol. Chem. 2003, 278, 36726-36732.

6. Toy, G.; Austin, W. R.; Liao, H.-I.; Cheng, D.; Singh, A.; Campbell, D. O.; Ishikawa, T.-o.; Lehmann, L. W.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Herschman, H. R.; Czernin, J.; Witte, O. N.; Radu, C. G., Requirement for Deoxycytidine Kinase in T and B Lymphocyte Development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010, 107, 5551-5556.

7. Austin, W. R.; Armijo, A. L.; Campbell, D. O.; Singh, A. S.; Hsieh, T.; Nathanson, D.; Herschman, H. R.; Phelps, M. E.; Witte, O. N.; Czernin, J.; Radu, C. G., Nucleoside Salvage Pathway Kinases Regulate Hematopoiesis by Linking Nucleotide Metabolism with Replication Stress. J. Exp. Med. 2012, 209, 2215-2228.

8. Van Rompay, A. R.; Johansson, M.; Karlsson, A., Substrate Specificity and Phosphorylation of Antiviral and Anticancer Nucleoside Analogs by Human Deoxyribonucleoside Kinases and Ribonucleoside Kinases. Pharmacol. Ther. 2003, 100, 119-139.

9. Yang, C.; Lee, M.; Hao, J.; Cui, X.; Guo, X.; Smal, C.; Bontemps, F.; Ma, S.; Liu, X.; Engler, D.; Parker, W. B.; Xu, B., Deoxycytidine kinase regulates the G2/M checkpoint through interaction with cyclin-dependent kinase 1 in response to DNA damage. Nucleic Acids Res 2012, 40 (19), 9621-32.

10. Tarver, J. E.; Jessop, T. C.; Carlsen, M.; Augeri, D. J.; Fu, Q.; Healy, J. P.; Heim-Riether, A.; Xu, A.; Taylor, J. A.; Shen, M.; Keyes, P. E.; Kimball, S. D.; Yu, X.-C.; Miranda, M.; Liu, Q.; Swaffield, J. C.; Nouraldeen, A.; Wilson, A. G. E.; Rinch, R.; Jhaver, K.; Foushee, A. M. D.; Anderson, S.; Oravecz, T.; Carson, K. G., 5-Fluorocytosine Derivatives as Inhibitors of Deoxycytidine Kinase. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 6780-6783.

11. Yu, X.-C.; Miranda, M.; Liu, Z.; Patel, S.; Nguyen, N.; Carson, K.; Liu, Q.; Swaffield, J. C., Novel Potent Inhibitors of Deoxycytidine Kinase Identified and Compared by Multiple Assays. J. Biomol. Screening 2010, 15, 72-79.

12. Ward, A. D.; Baker, B. R., Irreversible Enzyme Inhibitors: Active-Site-Directed Inhibitors of Deoxycytidine Kinase. J. Med. Chem. 1977, 20, 88-92.

13. Jessop, T. C.; Tarver, J. E.; Carlsen, M.; Xu, A.; Healy, J. P.; Heim-Riether, A.; Fu, Q.; Taylor, J. A.; Augeri, D. J.; Shen, M.; Stouch, T. R.; Swanson, R. V.; Tari, L. W.; Hunger, M.; Hoffman, I.; Keyes, P. E.; Yu, X.-C.; Miranda, M.; Liu, Q.; Swaffield, J. C.; Kimball, S. D.; Nouraldeen, A.; Wilson, A. G. E.; Foushee, A. M. D.; Jhaver, K.; Finch, R.; Anderson, S.; Oravecz, T.; Carson, K. G., Lead Optimization and Structure-based Design of Potent and Bioavailable Deoxycytidine Kinase Inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 6784-6787.

14. Weber, W. A.; Grosu, A. L.; Czernin, J., Technology Insight: Advances in Molecular Imaging and an Appraisal of PET/CT Scanning. Nat. Clin. Prac. Oncol. 2008, 5, 160-170.

15. Czernin, J.; Benz, M. R.; Allen-Auerbach, M. S., PET/CT Imaging: The Incremental Value of Assessing the Glucose Metabolic Phenotype and the Structure of Cancers in a Single Examination. Eur. J. Radiol. 2010, 73, 470-480.

16. Gambhir, S. S., Molecular Imaging of Cancer with Positron Emission Tomography. Nat. Rev. Cancer 2002, 2, 683-693.

17. Rigo, P.; Paulus, P.; Kaschten, B. J.; Hustinx, R.; Bury, T.; Jerusalem, G.; Benoit, T.; Foidart Willems, J., Oncological Application of Positron Emission Tomography with Fluorine-18. Eur. J. Nucl. Med. 1996, 23, 1641-1674.

18. Wood, K. A.; Hoskin, P. J.; Saunders, M. I., Positron Emission Tomography in Oncology: A Review. Clin. Oncol. 2007, 19, 237-255.

19. Weber, W. A., Positron Emission Tomography as an Imaging Biomarker. J. Clin. Oncol. 2006, 24, 3282-3292.

20. Oriuchi, N.; Higuchi, T.; Ishikita, T.; Miyakubo, M.; Hanaoka, H.; Iida, Y.; Endo, K., Present Role and Future Prospects of Positron Emission Tomography in Clinical Oncology. Cancer Sci. 2006, 97, 1291-1297.

21. Jadvar, H.; Alavi, A.; Gambhir, S. S., 18F-FDG Uptake in Lung, Breast, and Colon Cancers: Molecular Biology Correlates and Disease Characterization. J. Nucl. Med. 2009, 50, 1820-1827.

22. Hargreaves, R. J., The Role of Molecular Imaging in Drug Discovery and Development. Clin. Pharmacol. Ther. 2008, 83, 349-353.

23. Wang, J. L.; Maurer, L., Positron Emission Tomography: Applications in Drug Discovery and Drug Development. Curr. Top. Med. Chem. 2005, 5, 1053-1075.

24. Wagner, C. C.; Muller, M.; Lappin, G.; Langer, O., Positron Emission Tomography for Use in Microdosing Studies. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2008, 11, 104-110.

25. Laing, R. E.; Walter, M. A.; Campbell, D. O.; Herschman, H. R.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Czernin, J.; Witte, O. N.; Radu, C. R., Noninvasive Prediction of Tumor Responses to Gemcitabine using Positron Emission Tomography. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009, 106, 2847-2852.

26. Radu, C. G.; Shu, C. J.; Nair-Gill, E.; Shelly, S. M.; Barrio, J. R.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Witte, O. N., Molecular Imaging of Lymphoid Organs and Immune Activation by Positron Emission Tomography with a new [18F]-labeled 2'-deoxycytidine Analog. Nat. Med. 2008, 14, 783-788.

27. Shu, C. J.; Campbell, D. O.; Lee, J. T.; Tran, A. Q.; Wengrod, J. C.; Witte, O. N.; Phelps, M. E.; Satyamurthy, N.; Czernin, J.; Radu, C. R., Novel PET Probes Specific for Deoxycytidine Kinase. J. Nucl. Med. 2010, 51, 1092-1098.

28. Fan, F.; Wood, K. V., Bioluminescent assays for high-throughput screening. Assay Drug Dev Technol 2007, 5, 127-136.

29. Müller, K.; Faeh, C.; Diederich, F., Fluorine in Pharmaceuticals: Looking Beyond Intuition. Science 2007, 317, 1881-1886.

30. Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; O'Neill, P. M., Metabolsim of Fluorine-containing Drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001, 41, 443-470.

31. Crane, L. J.; Anastassiadou, M.; Stigliani, J.-L.; Baziard-Mouysset, G.; Payard, M., Reactions of Some Ortho and Para Halogenated Aromatic Nitriles with Ethylenediamine: Selective Synthesis of Imidazolines. Tetrahedron 2004, 60, 5325-5330.

32. Okonya, J. F.; Hoffman, R. V.; Johnson, M. C., Synthesis of 2-Oxazolone-4-Carboxylates from 3-Nosyloxy- and 3-Bromo-2-ketoesters. J. Org. Chem. 2002, 67, 1102-1108.

33. Trullinger, T. K.; Hunter, R.; Garizi, N.; Yap, M. C. H.; Buysse, A. M.; Pernich, D.; Johnson, T. C.; Bryan, K.; Deamicis, C.; Zhang, Y.; Niyaz, N. M.; McLeod, C. L.; Ross, R.; Zhu, Y.; Johnson, P. L.; Eckelbarger, J. D.; Parker, M. H., Pesticidal Compositions. Patent application US 2010/0292253 A1.

34. Joseph, K. M.; Larraza-Sanchez, I., Synthesis of Benzyl Bromides with Hexabromoacetone: an Alternative Path to Drug Intermediates. Tetrahedron Lett. 2011, 52, 13-16.

35. Laxer, A.; Major, D. T.; Gottlieb, H. E.; Fischer, B., (15N5)-Labeled Adenine Derivatives: Synthesis and Studies of Tautomerism by 15N NMR Spectroscopy and Theoretical Calculations. J. Org. Chem. 2001, 66, 5463-5481.

36. Chottiner, E. G.; Shewach, D. S.; Datta, N. S.; Ashcraft, E.; Gribbin, D.; Ginsburg, D.; Fox, I. H.; Mitchell, B. S., Cloning and Expression of Human Deoxycytidine Kinase cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991, 88, 1531-1535.

37. Shewach, D. S.; Reynolds, K. K.; Hertel, L., Nucleotide Specificity of Human Deoxycytidine Kinase. Mol. Pharmacol. 1992, 42, 518-524.

38. Metropolis, N.; Ulam, S., The Monte Carlo Method. J. Am. Statistical Assn. 1949, 44, 335-341.

39. Zwanzig, R. W., High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. J. Chem. Phys. 1954, 22, 1420-1426.

40. Jorgensen, W. L.; Thomas, L. L., Perspective on Free-Energy Perturbation Calculations for Chemical Equilibria. J. Chem. Theory Comput 2008, 4, 869-876.

41. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J., Molecular Modeling of Organic and Biomolecular Systems Using BOSS and MCPRO. J. Comput. Chem. 2005, 26, 1689-1700.

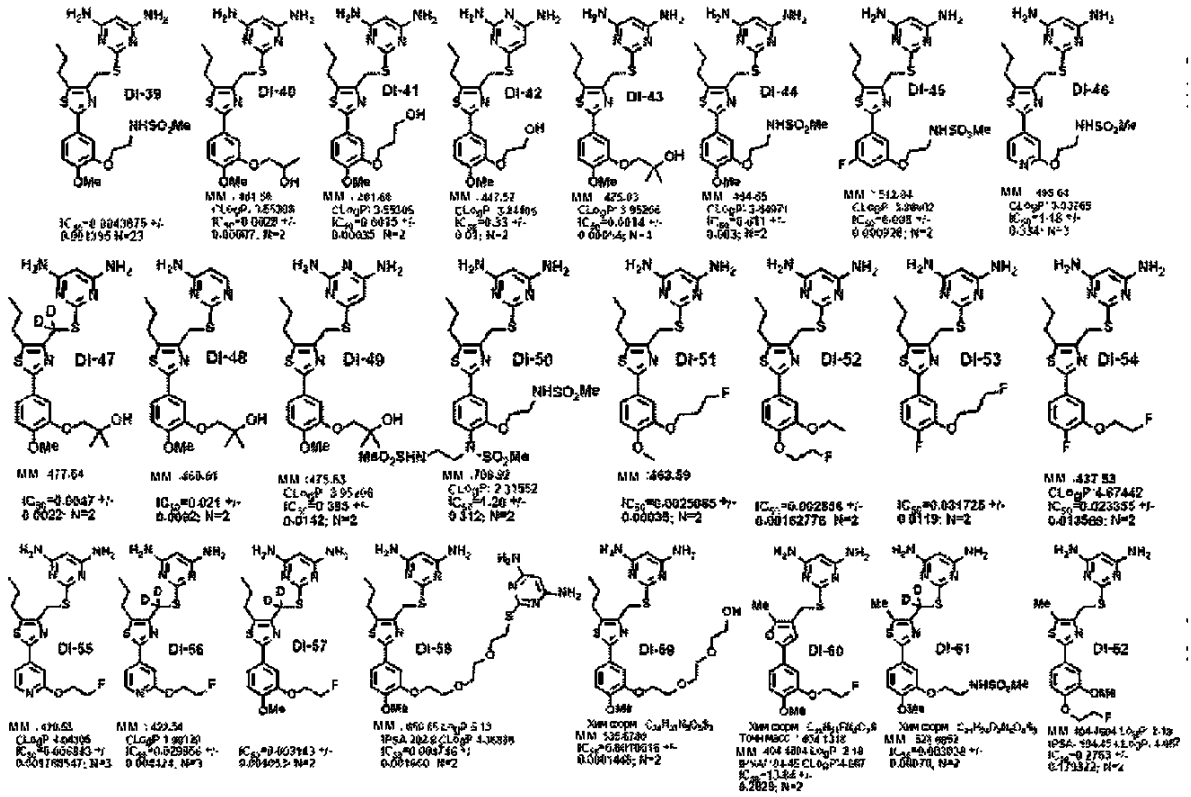
42. Shu, Y. Z.; Johnson, B. M.; Yang, T. J., Role of biotransformation studies in minimizing metabolism-related liabilities in drug discovery. AAPS 2008, 10, 178-192.

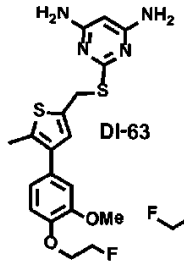
43. Bhattacharyya, S., Application of Positron Emission Tomography in Drug Development. Biochem. Pharmacol. 2012, 1, 1000e128.

44. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. J. Chem. Phys. 1983, 79, 926-935.

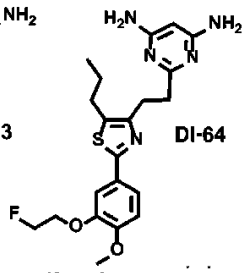
45. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J., Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. . J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 11225-11236.

4) Пример 4

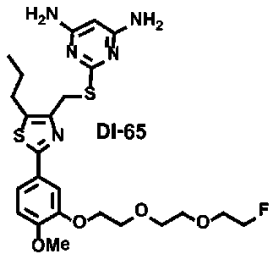

DI-39
DI-40
DI-41
DI-42
DI-43
DI-44
DI-45
DI-46
DI-47
DI-48
DI-49
DI-50
DI-51
DI-52
DI-53
DI-54
DI-55
DI-56
DI-57
DI-58
DI-59
DI-60
DI-61
DI-62



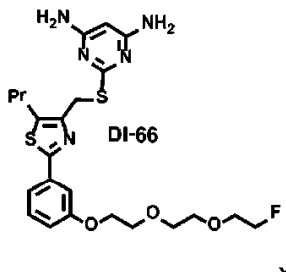
M.M.: 420.5214
LogP: 2.23 rPSA: 95.22
CLogP: 3.55306
IC_{50}=1.581 +/-
0.0212; N=2



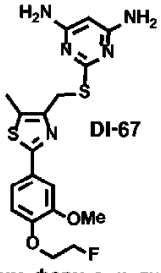
Хим. форм. $C_{21}H_{26}FN_5O_2S$
M.M.: 431.5304 LogP: 3.59
tPSA: 107.58 CLogP: 4.04506
IC_{50}=0.6639 +/-
0.3655; N=3



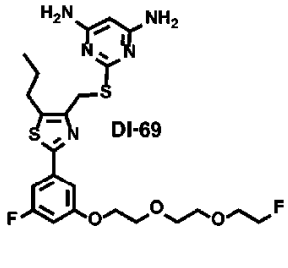
M.M.: 537.67 LogP: 4.69
tPSA: 126.04
IC_{50}=0.00421 +/-
0.001983; N=2



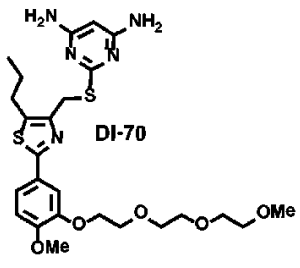
Хим. форм. $C_{23}H_{30}FN_5O_3S_2$
M.M.: 507.6434 LogP: 3.13
tPSA: 116.81 CLogP: 4.26931
IC_{50}=0.069085 +/-
0.046407; N=2



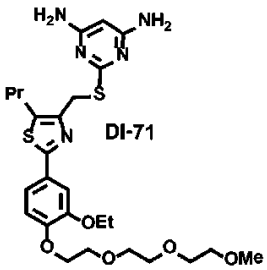
Хим. форм. $C_{19}H_{21}FN_4O_2S_2$
M.M.: 420.5214 LogP: 2.91
tPSA: 95.22 CLogP: 4.55307
IC_{50}=0.26295 +/-
0.15662; N=2



M.M.: 525.6338
IC_{50}=0.0033685 +/-
0.00358; N=2

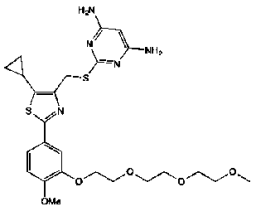


M.M.: 549.7050
LogP: 4.34 tPSA: 135.27
IC_{50}=0.003307 +/-
0.000442; N=2



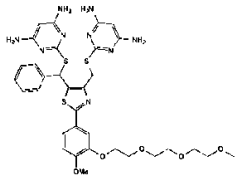
Хим. форм. $C_{26}H_{37}N_5O_5S_2$
Точн. масс.: 563.2236
M.M.: 563.7320 LogP: 3
tPSA: 135.27 CLogP: 4.26466
IC_{50}=0.0023695 +/-
0.0004348; N=2

DI-77



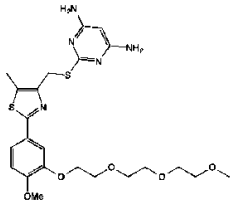
IC_{50}=0.0052835 +/- 0.003533; N=2

DI-78



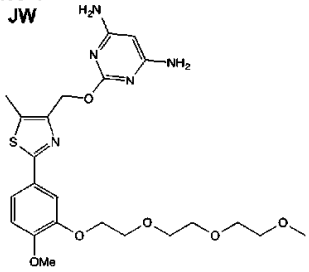
IC_{50}=1.665 +/- 0.60 ; N =2

DI-79

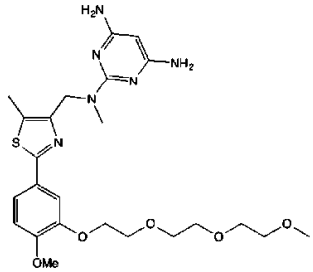


IC_{50}= 0.009301 +/- 0.0002418 ; N =2

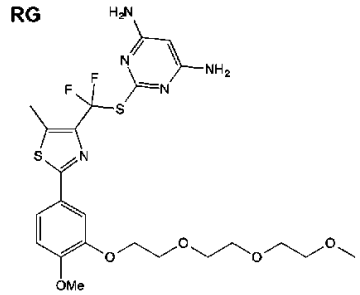
NC-1 JW



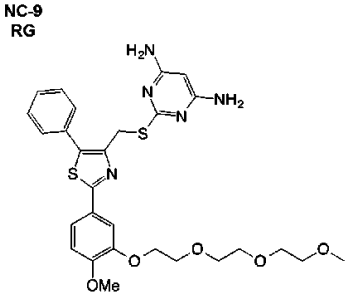
NC-2 JW



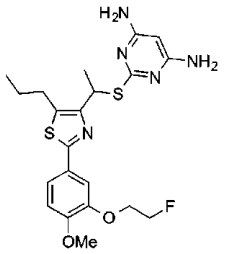
NC-4 RG



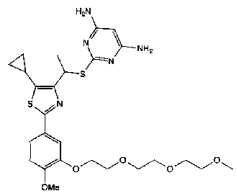
NC-9 RG



5) Пример 5



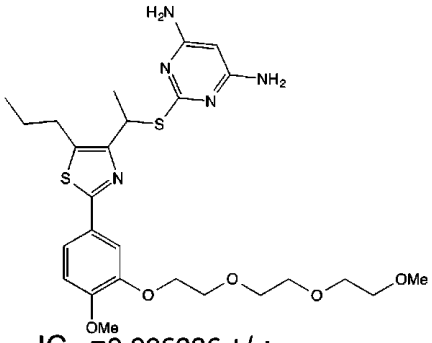
DI-80



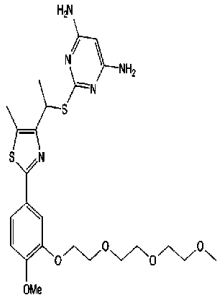
IC_{50}= 0.010 +/- 0.0043; N =3

IC_{50}= 0.002465 +/- 0.003202; N =2

DI-73



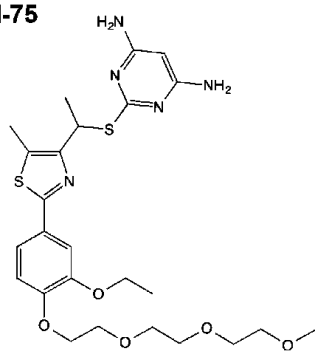
DI-74



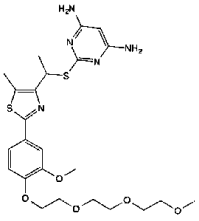
IC_{50}=0.006006 +/-; 0.002477N =2

IC_{50}= 0.0080306 +/- 0.003160 ; N =3

DI-75



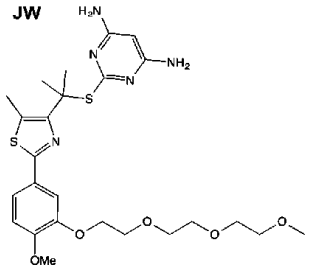
DI-76



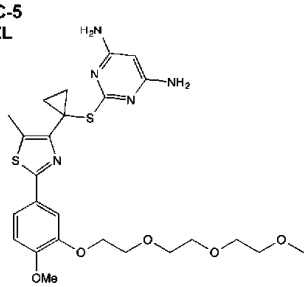
IC_{50}= 0.0032 +/- 0.0032; N =2

IC_{50}=0.006124 +/- ; 0.003206 N =2

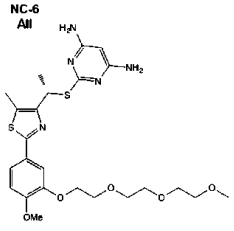
NC-3 JW



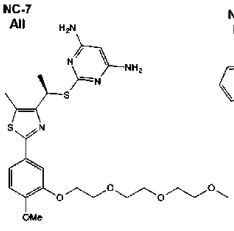
NC-5 ZL



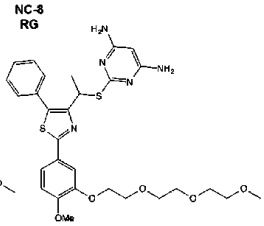
NC-6 All



NC-7 All

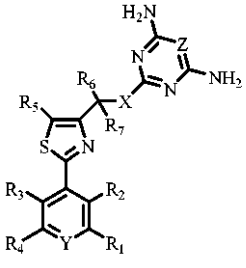


NC-8 RG



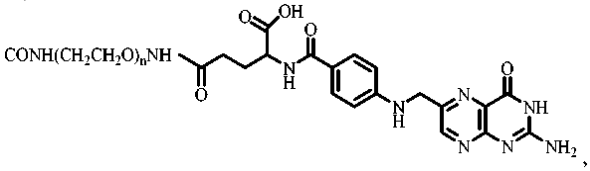
VI. Варианты реализации изобретения.

Вариант реализации изобретения P1, соединение формулы (pI)

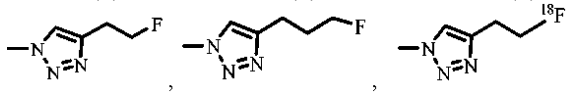


(pI)

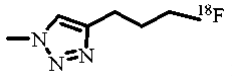
или его соль, где каждый Y и Z представляет собой независимо CR_8 или N; R_8 представляет собой H, F, Cl, Br, I, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, CF_3, ^{18}F или OR_9; R_9 независимо представляет собой CH_3, C_2H_5, CD_3, CD_2CD_3, CH_2CH_2OH, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2C(CH_3)_2OH$, $CH_2CH_2C(CH_3)_2OH$, CH_2CH_2F, $CH_2CH_2CH_2F$, $CH_2C(CH_3)_2F$, $CH_2CH_2C(CH_3)_2F$, $CH_2CH_2\,^{18}F$, $CH_2CH_2CH_2\,^{18}F$,



$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2G$ или $COCH_2CH_2COO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2L$; n представляет собой 2-20; G представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3, OCF_3, F, Cl, N_3, ^{18}F, $NHCH_2C_6H_4NO_2(p)$, $NHCH_2C_6H_4F(p)$, $NHCH_2C_6H_4\,^{18}F(p)$, $NHCH_2C_6H_4NO_2(o)$, $NHCH_2C_6H_4F(o)$, $NHCH_2C_6H_4\,^{18}F(o)$,

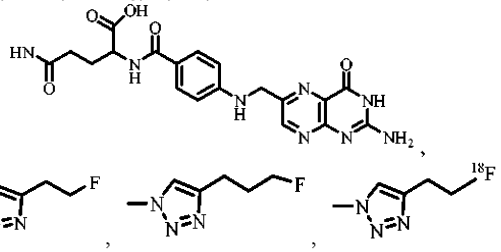


или

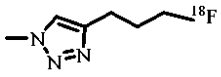


;

L представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3, F, Cl,

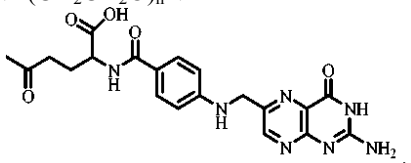


или

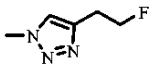


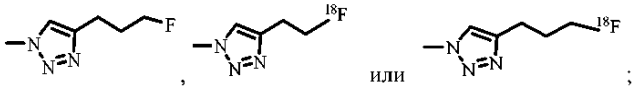
;

R_1 и R_4 независимо представляют собой H, F, Cl, Br, I, CF_3, ^{18}F или OR_{10}; R_{10} независимо представляет собой H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, CD_3, CD_2CD_3, CH_2CH_2OH, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2CH(OH)CH_3$, $CH_2CH_2CH(OH)CH_3$, $CH_2C(CH_3)_2OH$, $CH_2CH_2C(CH_3)_2OH$, CH_2CH_2F, $CH_2CH_2CH_2F$, $CH_2CH(F)CH_3$, $CH_2CH_2CH(F)CH_3$, $CH_2CH_2\,^{18}F$, $CH_2CH_2CH_2\,^{18}F$, $CH_2CH(^{18}F)CH_3$, $CH_2CH_2CH(^{18}F)CH_3$, $CH_2C(CH_3)_2F$, $CH_2CH_2C(CH_3)_2F$, CH_2CH_2Cl, $CH_2CH_2CH_2Cl$, $CH_2CH(Cl)CH_3$, $CH_2CH_2CH(Cl)CH_3$, $CH_2C(CH_3)_2Cl$, $CH_2CH_2C(CH_3)_2Cl$, $CH_2CH_2NHSO_2CH_3$, $CH_2CH_2CH_2NHSO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$, $CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2\,^{18}F)SO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2Cl)SO_2CH_3$, $CONH(CH_2CH_2O)_nNH$

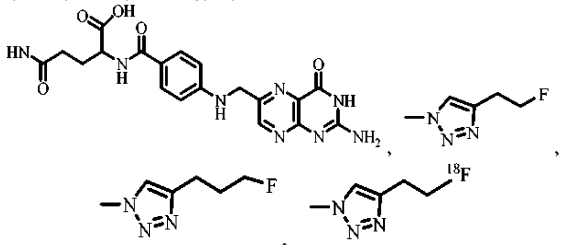


$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2G$ или $COCH_2CH_2COO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2L$; n представляет собой 2-20; G представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3, OCF_3, F, Cl, N_3, ^{18}F, $NHCH_2C_6H_4NO_2(p)$, $NHCH_2C_6H_4F(p)$, $NHCH_2C_6H_4\,^{18}F(p)$, $NHCH_2C_6H_4NO_2(o)$, $NHCH_2C_6H_4F(o)$, $NHCH_2C_6H_4\,^{18}F(o)$,

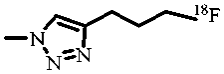




L представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3, F, Cl

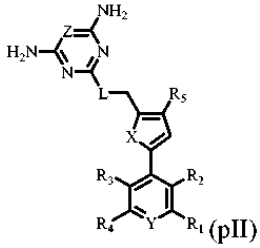


или



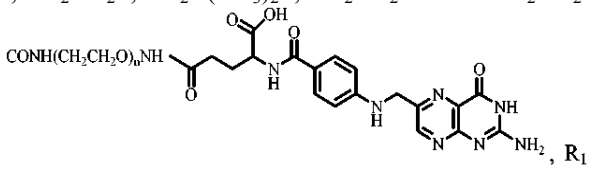
R_2 и R_3 независимо представляют собой H, F, Cl, Br, I или OR_{11}; R_{11} независимо представляет собой H, CH_3, C_2H_5, CD_3, CD_2CD_3, CH_2CH_2OH, CH_2CH_2F, CH_2CH_2 ^{18}F, $CH_2CH_2NHSO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$, или $CH_2CH_2N(CH_2CH_2{}^{18}F)SO_2CH_3$; R_5 независимо представляет собой H, C_1-C_6 n-алкильную цепь, C_1-C_6 разветвленную алкильную цепь, CH_2-C_3-C_6 циклоалкил, $(CH_2)_mOH$, $(CH_2)_mOCH_3$, $(CH_2)_mF$, $(CH_2)_m{}^{18}F$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2C_6H_4{}^{18}F$, $CH_2CH_2C_6H_5$, $CH_2CH_2C_6H_4{}^{18}F$; $CH_2CH_2CH_2C_6H_5$, C_6H_5, C_6H_4F, $C_6H_4{}^{18}F$, $C_6H_4OCH_3$, $C_6H_4CH_2CH_2F$, $C_6H_4CH_2CH_2{}^{18}F$, 2-, 3- или 4-пиридил, 3-фтор-4-пиридил, 3-[^{18}P]фтор-4-пиридил или CH_2CH_2-2-, 3- или 4-пиридил; m представляет собой 1-6; X представляет собой CH_2, O, NR_{12}, S, SO или SO_2; R_{12} представляет собой H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, $CH_2C_6H_5$; R_6 и R_7 независимо представляют собой H, D, F, CH_3 или R и S CH_3 стереоизомеры; и R_6 и R_7 вместе C_3-C_6 циклоалкил.

Вариант реализации изобретения P2, соединение формулы (pII)



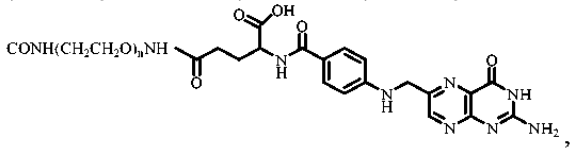
(pII)

или его соль, где каждый Y и Z представляет собой независимо CR_6 или N; R_6 представляет собой H, F, Cl, Br, I, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, CF_3, ^{18}F или OR_7; R_7 независимо представляет собой CH_3, CD_3, CH_2CH_2OH, $CH_2C(CH_3)_2OH$, CH_2CH_2F, $CH_2C(CH_3)_2F$, CH_2CH_2 ^{18}F или $CH_2CH_2CH_2{}^{18}F$,

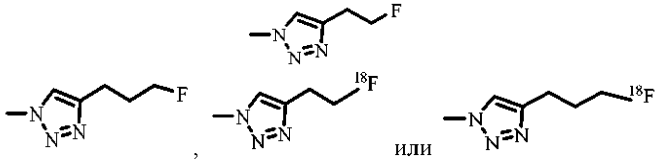


, R_1

и R_4 независимо представляют собой H, F, Cl, Br, I, ^{18}F или OR_8; R_8 независимо представляет собой H, CH_3, C_2H_5, CH_2CH_2OH, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2C(CH_3)_2OH$, CH_2CH_2F, $CH_2CH_2CH_2F$, CH_2CH_2 ^{18}F, $CH_2CH_2CH_2{}^{18}F$, $CH_2C(CH_3)_2F$, CH_2CH_2Cl, $CH_2C(CH_3)_2Cl$, $CH_2CH_2NHSO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2{}^{18}F)SO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2Cl)SO_2CH_3$,

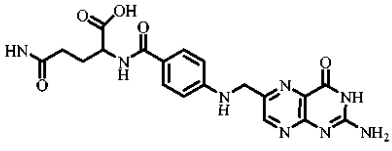
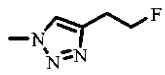


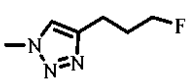
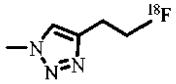
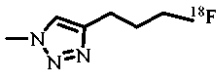
, $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2G$ или $COCH_2CH_2COO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2K$; n представляет собой 2-20; G представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3; OCF_3, F, Cl, N_3, ^{18}F, $NHCH_2C_6H_4NO_2$(p), $NHCH_2C_6H_4F$(p), $NHCH_2C_6H_4{}^{18}F$(p), $NHCH_2C_6H_4NO_2$(o), $NHCH_2C_6H_4F$(o), $NHCH_2C_6H_4{}^{18}F$(o),



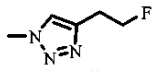
;

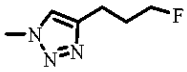
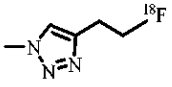
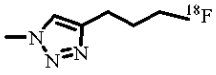
K представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3, F, Cl,

 ,  ,

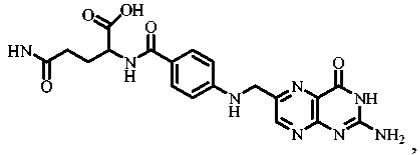
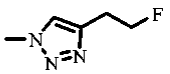
 ,  или  ;

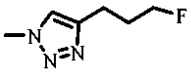
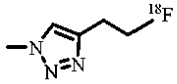
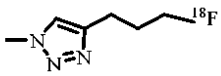
$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2G$ или $COCH_2CH_2COO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2K$; n представляет собой 2-20; G представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3; OCF_3, F, Cl, N_3, ^{18}F, $NHCH_2C_6H_4NO_2$(p), $NHCH_2C_6H_4F$(p), $NHCH_2C_6H_4{}^{18}F$(p), $NHCH_2C_6H_4NO_2$(o), $NHCH_2C_6H_4F$(o), $NHCH_2C_6H_4{}^{18}F$(o),



 ,  или  ;

K представляет собой H, OH, NH_2, OCH_3, F, Cl,

 ,  ,

 ,  или  ;

R_2 и R_3 независимо представляют собой H, F, Cl, Br, I или OR_9; R_9 независимо представляет собой H, CH_3, C_2H_5, CH_2CH_2OH, CH_2CH_2F, $CH_2CH_2{}^{18}F$, $CH_2CH_2NHSO_2CH_3$, $CH_2CH_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$, или $CH_2CH_2N(CH_2CH_2{}^{18}F)SO_2CH_3$; R_5 независимо представляет собой H, C_1-C_6 n-алкильную цепь, C_1-C_6 разветвленную алкильная цепь, CH_2-C_3-C_6 циклоалкил, $(CH_2)_mOH$, $(CH_2)_mOCH_3$, $(CH_2)_mF$, $(CH_2)_m{}^{18}F$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2C_6H_4{}^{18}F$, $CH_2CH_2C_6H_5$, $CH_2CH_2C_6H_4{}^{18}F$; $CH_2CH_2CH_2C_6H_5$, C_6H_5, C_6H_4F, $C_6H_4{}^{18}F$, $C_6H_4OCH_3$, $C_6H_4CH_2CH_2F$, $C_6H_4CH_2CH_2{}^{18}F$, 2-, 3- или 4-пиридил, 3-фтор-4-пиридил, 3-[^{18}F]фтор-4-пиридил или CH_2CH_2- 2-, 3- или 4-пиридил; m представляет собой 1-6; X представляет собой O, NR_{10}, S, SO или SO_2; R_{10} представляет собой H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, $CH_2C_6H_5$; и L представляет собой CH_2, O, NR_{10}, S, SO, SO_2.

Вариант реализации изобретения P3, где соединение имеет формулу, показанную в приложении A, B или C (примеры 1-5).

Вариант реализации изобретения P4. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P3, где соединение связывается с полипептидом дезоксицитидинкиназы.

Вариант реализации изобретения P5. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P4, или его соль и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант реализации изобретения P6. Способ ингибирования активности дезоксицитидинкиназы (dCK), включающий контактирование соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1-P5 с дезоксицитидинкиназой.

Вариант реализации изобретения P7. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1-P5, или его фармацевтически приемлемой соли и тимидин, где соединение вводят в сочетании с тимидином.

Вариант реализации изобретения P8. Способ варианта реализации изобретения P7, где рак представляет собой лейкоз, лимфому, рак молочной железы, рак яичников, рак легкого, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, саркому, рак головы и шеи, глиому, глиобластому или рак ткани независимо от происхождения, который характеризуется геномной нестабильностью и/или активацией ответа повреждения ДНК.

Вариант реализации изобретения P9. Способ лечения иммунного нарушения у индивидуума, который в этом нуждается, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1-P5, или его фармацевтически приемлемой соли.

Вариант реализации изобретения P10. PET зонд, включающий соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P5.

Вариант реализации изобретения P11. Способ визуализации, включающий контактирование соединения из варианта реализации изобретения P10 с биологическим материалом; применение PET визуализации для определения локальной концентрации соединения в биологическом материале; и соотнесение локальной концентрации соединения с локальным иммунным ответом или присутствием опухолевой ткани.

Вариант реализации изобретения P12. Способ варианта реализации изобретения P11, где контактирование соединения с биологическим материалом включает введение количества соединения животному или человеку; и соотнесение локальной концентрации соединения в животном или человеке с локальным иммунным ответом или опухолевой тканью в животном или человеке.

Вариант реализации изобретения P13. Способ варианта реализации изобретения P12, дополнительно включающий использование локальной концентрации соединения для диагностики рака и/или мониторинга лечения рака.

Вариант реализации изобретения P14. Способ вариантов реализации изобретения P11, где животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из рака, аутоиммунного нарушения, расстройства развития, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, паразитарной инфекции, инфекции, метаболического заболевания и воспаления.

Вариант реализации изобретения P15. Способ варианта реализации изобретения P11, где животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из лимфоденопатии, меланомы, лейкоза и глиомы.

Вариант реализации изобретения P16. Способ варианта реализации изобретения P11, где животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE), рассеянного склероза, диабета типа 1 и атеросклероза.

Вариант реализации изобретения P17. Способ варианта реализации изобретения P11, где животное или человек подвергают терапии, выбранной из группы, состоящей из иммунотерапии рака, иммунотерапии, терапии интерфероном, вакцинации, лучевой терапии, химиотерапии и терапии антибиотиками.

Вариант реализации изобретения P18. Способ прогнозирования резистентности к онколитическому агенту, включающий контактирование соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1-P5 с опухолью; применение PET визуализации для определения локальной концентрации соединения в опухоли; сравнение локальной концентрации соединения с базовым уровнем; соотнесение локальной концентрации соединения в значительной степени более низкой, чем базовый уровень с низкой dCK экспрессией опухоли; соотнесение низкой dCK экспрессии опухоли с резистентностью к онколитическому нуклеозидному аналогу, где базовый уровень соответствует измеренной концентрации соединения в типичных опухолевых клетках, которые экспрессируют dCK, концентрации соединения в типичных опухолевых клетках, которые не экспрессируют dCK, или взвешенному среднему.

Вариант реализации изобретения P19. Способ варианта реализации изобретения P18, где опухоль является Т лимфоцитного происхождения.

Вариант реализации изобретения P20. Способ для проверки использования соединения в PET процессе, где способ включает стадии: (a) введения "холодного" атома фтора 19 в определенное положение в соединении по любому из вариантов реализации изобретения 1-5; (b) замещение "холодного" атома фтора 19 на "горячий" атом фтора 18; (c) введение соединения со стадии (b) млекопитающему; и (d) детектирование и/или количественное определение соединения со стадии (b) по всему телу млекопитающего, используя PET визуализацию.

Вариант реализации изобретения P21. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P4, где R_6 представляет собой метил.

Вариант реализации изобретения P22. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P4 и P21, где R_6 присоединяется к углероду, имеющему (R) стереохимию.

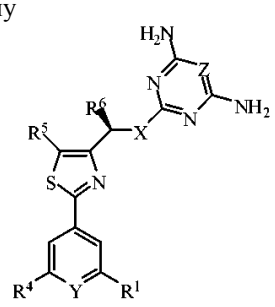
Вариант реализации изобретения P23. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P4 и P21-P22, где R_5 представляет собой незамещенный C_1-C_6-алкил, предпочтительно метил.

Вариант реализации изобретения P24. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P4 и P21-P23, где R7 представляет собой водород и присоединяется к углероду, имеющему (R) стереохимию.

Вариант реализации изобретения P25. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1-P4 и P21-P24, где R_9 представляет собой $-O(CH_2)_2NHS(O)_2CH_3$.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее формулу



(IA),

где Y представляет собой $C(R^8)$;

Z представляет собой $C(R^9)$ или N;

X представляет собой CH_2, O, $N(R^{10})$, S или S(O);

R^1 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{1A}$, $-OR^{1A}$, $-NR^{1A}R^{1B}$, $-C(O)OR^{1A}$, $-C(O)NR^{1A}R^{1B}$, $-NO_2$, $-SR^{1A}$, $-S(O)_{n1}R^{1A}$, $-S(O)_{n1}OR^{1A}$, $-S(O)_{n1}NR^{1A}R^{1B}$, $-NHNR^{1A}R^{1B}$, $-ONR^{1A}R^{1B}$, $-NHC(O)NHNR^{1A}R^{1B}$, замещенный R^{1A} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{1A} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{1A} или незамещенный фенил или замещенный R^{1A} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{1A} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, $-OR^{12}$, $-N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-COOR^{12}$, $-CON(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NO_2$, $-S(R^{12})$, $-S(O)_2R^{12}$, $-S(O)_3R^{12}$, $-S(O)_4R^{12}$, $-S(O)_2N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHN(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-ON(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHC(O)NHN(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHC(O)N(R^{12,1})(R^{12,2})$, $-NHS(O)_2R^{12}$, $-NHC(O)R^{12}$, $-NHC(O)OR^{12}$, $-NHOR^{12}$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{11} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{11} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{11} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{11} или незамещенный фенил или замещенный R^{11} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{11} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{12} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{12} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{12} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{12} или незамещенный фенил или замещенный R^{12} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{12}, $R^{12,1}$ и $R^{12,2}$ независимо представляют собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенный C_1-C_6-алкил, незамещенный 2-6-членный гетероалкил, незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, незамещенный фенил или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^4 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{4A}$, $-OR^{4A}$, $-NR^{4A}R^{4B}$, $-C(O)OR^{4A}$, $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$, $-NO_2$, $-SR^{4A}$, $-S(O)_{n4}R^{4A}$, $-S(O)_{n4}OR^{4A}$, $-S(O)_{n4}NR^{4A}R^{4B}$, $-NHNR^{4A}R^{4B}$, $-ONR^{4A}R^{4B}$, $-NHC(O)NHNR^{4A}R^{4B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^5 независимо представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{5A}$, $-OR^{5A}$, $-NR^{5A}R^{5B}$, $-C(O)OR^{5A}$, $-C(O)NR^{5A}R^{5B}$, $-NO_2$, $-SR^{5A}$, $-S(O)_{n5}R^{5A}$, $-S(O)_{n5}OR^{5A}$, $-S(O)_{n5}NR^{5A}R^{5B}$, $-NHNR^{5A}R^{5B}$, $-ONR^{5A}R^{5B}$, $-NHC(O)NHNR^{5A}R^{5B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил, где R^5 и R^6 необязательно объединяются с образованием замещенного или незамещенного C_3-C_6-циклоалкила; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^6 представляет собой незамещенный C_1-C_6-алкил;

R^8 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{8A}$, $-OR^{8A}$, $-NR^{8A}R^{8B}$, $-C(O)OR^{8A}$, $-C(O)NR^{8A}R^{8B}$, $-NO_2$, $-SR^{8A}$, $-S(O)_{n8}R^{8A}$, $-S(O)_{n8}OR^{8A}$, $-S(O)_{n8}NR^{8A}R^{8B}$, $-NHNR^{8A}R^{8B}$, $-ONR^{8A}R^{8B}$, $-NHC(O)NHNR^{8A}R^{8B}$, замещенный R^{8A} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{8A} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{8A} или незамещенный фенил, или замещенный R^{8A} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{8A} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, $-OR^{15}$, $-N(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-COOR^{15}$, $-CON(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NO_2$, $-SR^{15}$, $-S(O)_2R^{15}$, $-S(O)_3R^{15}$, $-S(O)_4R^{15}$, $-S(O)_2N(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHN(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-ON(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHC(O)NHN(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHC(O)N(R^{15,1})(R^{15,2})$, $-NHS(O)_2R^{15}$, $-NHC(O)R^{15}$, $-NHC(O)OR^{15}$, $-NHOR^{15}$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{15} или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{15} или незамещенный C_2-C_6-гетероалкил, замещенный R^{15} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{15} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{15} или незамещенный фенил или замещенный R^{15} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{15}, $R^{15,1}$ и $R^{15,2}$ независимо представляют собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный R^{16} или неза-

мещенный C_1-C_6-алкил, замещенный R^{16} или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный R^{16} или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный R^{16} или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный R^{16} или незамещенный фенил или замещенный R^{16} или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^{16} представляет собой водород, галоген, оксо, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенный C_1-C_6-алкил, незамещенный 2-6-членный гетероалкил, незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, незамещенный фенил или незамещенный 5-6-членный гетероарил;

R^9 представляет собой водород, галоген, $-N_3$, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-CI_3$, -CN, $-COR^{9A}$, $-OR^{9A}$, $-NR^{9A}R^{9B}$, $-C(O)OR^{9A}$, $-C(O)NR^{9A}R^{9B}$, $-NO_2$, $-SR^{9A}$, $-S(O)_{n9}R^{9A}$, $-S(O)_{n9}OR^{9A}$, $-S(O)_{n9}NR^{9A}R^{9B}$, $-NHNR^{9B}R^{8B}$, $-ONR^{9A}R^{9B}$, $-NHC(O)NHNR^{9A}R^{9B}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

R^{10} представляет собой H, $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$, $-CH_2C_6H_5$;

R^{1B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{8B}, R^{9A} и R^{9B} независимо представляют собой водород, оксо, галоген, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-S(O)_2Cl$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил; где каждый замещенный C_1-C_6-алкил, замещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный фенил и замещенный 5-6-членный гетероарил замещен по меньшей мере одним заместителем;

n1, n4, n5, n8, и n9 независимо представляют собой 1, 2, или 3; и

где заместитель у R^4, R^5, R^9, R^{1B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{8B}, R^{9A} и R^{9B} выбирают из:

(A) оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(B) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(i) оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила;

(ii) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(a) оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила, и

(b) C_1-C_6-алкила, C_2-C_6-гетероалкила, C_3-C_6-циклоалкила, C_3-C_6-гетероциклоалкила, фенила и C_5-C_6-гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из оксо, галогена, $-CF_3$, -CN, -OH, $-NH_2$, -COOH, $-CONH_2$, $-NO_2$, -SH, $-SO_2Cl$, $-SO_3H$, $-SO_4H$, $-SO_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC=(O)NHNH_2$, $-NHC=(O)NH_2$, $-NHSO_2H$, -NHC=(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, незамещенного C_1-C_6-алкила, незамещенного C_2-C_6-гетероалкила, незамещенного C_3-C_6-циклоалкила, незамещенного C_3-C_6-гетероциклоалкила, незамещенного фенила, незамещенного C_5-C_6-гетероарила,

где гетероалкил, гетероциклил и гетероарил содержат по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S.

2. Соединение по п.1, где R^4 представляет собой водород.

3. Соединение по п.2, где каждый из R^5 и R^6 представляет собой незамещенный C_1-C_6-алкил.

4. Соединение по п.1, где R^1 представляет собой водород, галоген, $-OR^{1A}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил.

5. Соединение по п.4, где R^1 представляет собой $-OR^{1A}$ и R^{1A} представляет собой замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил или замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил.

6. Соединение по п.5, где R^{1A} представляет собой $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$, $-CD_3$, $-CD_2CD_3$, $-(CH_2)_2OH$, $-(CH_2)_3OH$, $-CH_2CH(OH)CH_3$, $-(CH_2)_2CH(OH)CH_3$, $-CH_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2F$, $-(CH_2)_3F$, $-CH_2CH(F)CH_3$, $-(CH_2)_2CH(F)CH_3$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2F$, $-(CH_2)_2Cl$, $-(CH_2)_3Cl$, $-CH_2CH(Cl)CH_3$, $-(CH_2)_2CH(Cl)CH_3$, $-CH_2C(CH_3)_2Cl$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2Cl$, $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$, $-(CH_2)_3NHSO_2CH_3$, $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$, $-(CH_2)_3N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$, $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$ или $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2Cl)SO_2CH_3$.

7. Соединение по п.1, где R^8 представляет собой водород, галоген, $-OR^{8A}$, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил, замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил, замещенный или незамещенный C_3-C_6-циклоалкил, замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный фенил или замещенный или незамещенный 5-6-членный гетероарил.

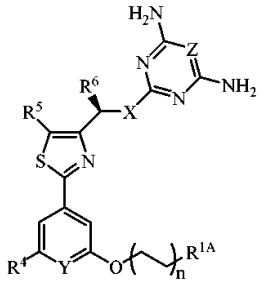
8. Соединение по п.7, где R^8 представляет собой $-OR^{8A}$ и R^{8A} представляет собой водород, замещенный или незамещенный C_1-C_6-алкил или замещенный или незамещенный 2-6-членный гетероалкил.

9. Соединение по п.8, где R^{8A} представляет собой $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-CD_3$, $-CD_2CD_3$, $-(CH_2)_2OH$, $-(CH_2CH_2)_3OH$, $-CH_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2OH$, $-(CH_2)_2F$, $-(CH_2)_3F$, $-CH_2C(CH_3)_2F$ или $-(CH_2)_2C(CH_3)_2F$.

10. Соединение по п.1, где Z представляет собой CH.

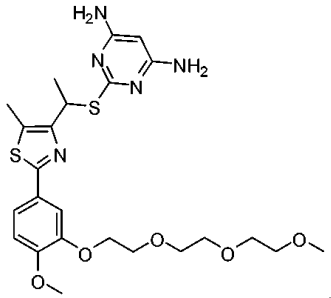
11. Соединение по п.1, где X представляет собой S.

12. Соединение по п.1, имеющее формулу

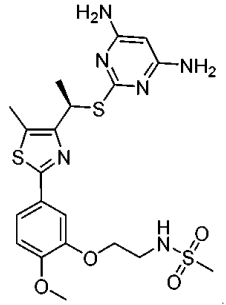


13. Соединение по п.4, где R^{1A} представляет собой замещенный или незамещенный 3-6-членный гетероциклоалкил.

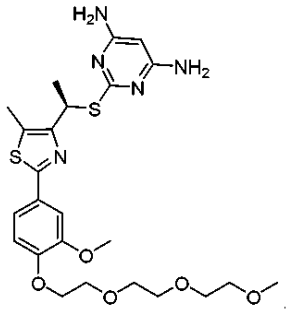
14. Соединение по п.1, имеющее формулу



15. Соединение по п.1, имеющее формулу



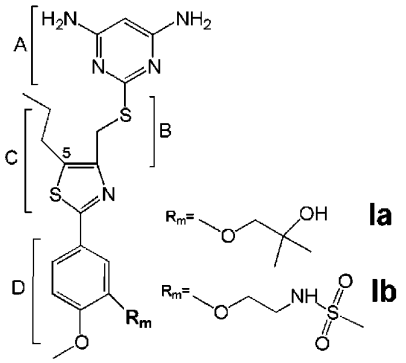
16. Соединение по п.1, имеющее формулу



17. Фармацевтический препарат, включающий соединение по одному из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

18. Способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение указанному субъекту эффективного количества соединения по п.1, где указанный рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

A

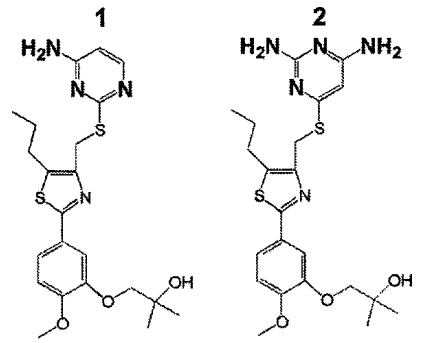


B

Соединение	Стационарная кинетика IC_{50}^{app} (нМ)	Стационарная кинетика K_i^{app} (нМ)	CEM клетки IC_{50} (нМ)
Ia	14.5 ± 2.8	0.8 ± 0.7	1.4
Ib	14.1 ± 3.0	0.5 ± 0.5	4.9

Фиг. 1

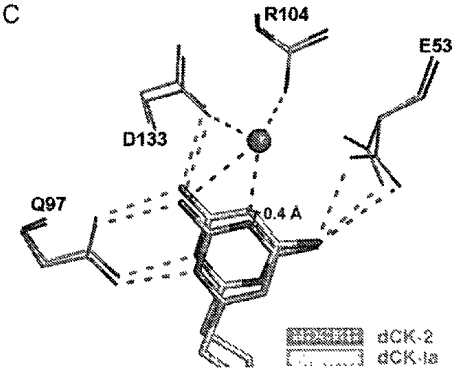
A



B

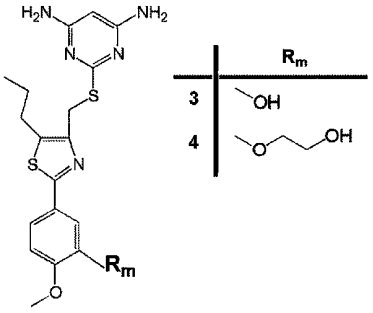
Соединение	Стационарная кинетика IC_{50}^{app} (нМ)	K_i^{app} (нМ)	CEM клетки IC_{50} (нМ)
1	11.2 ± 1.1	1.8 ± 1.7	21.8
2	754 ± 58	735 ± 55	Н.У.

C



Фиг. 2

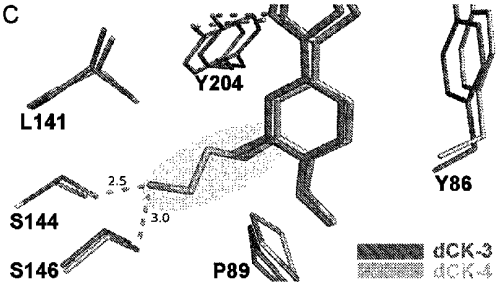
A



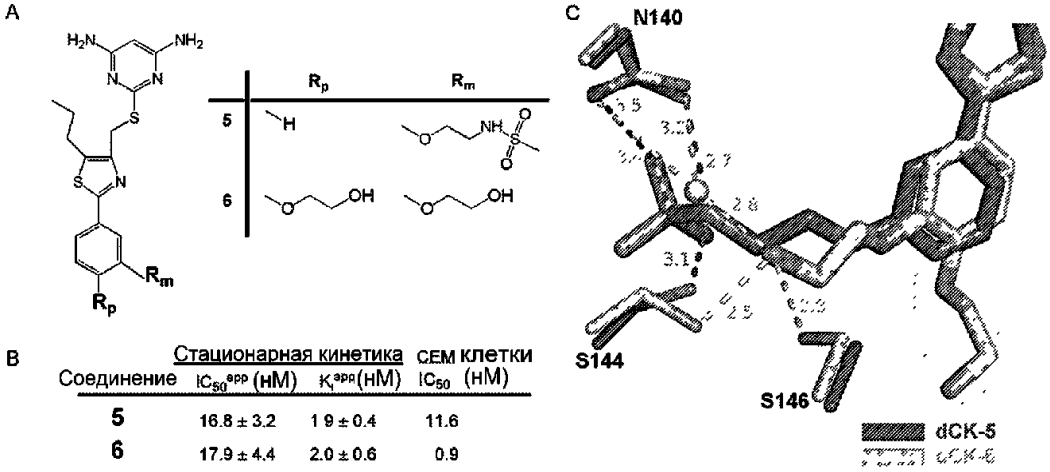
B

Соединение	Стационарная кинетика IC_{50}^{app} (нМ)	K_i^{app} (нМ)	CEM клетки IC_{50} (нМ)
3	26.1 ± 4.0	8.9 ± 0.9	18.6
4	14.6 ± 3.6	0.5 ± 0.4	1.15

C

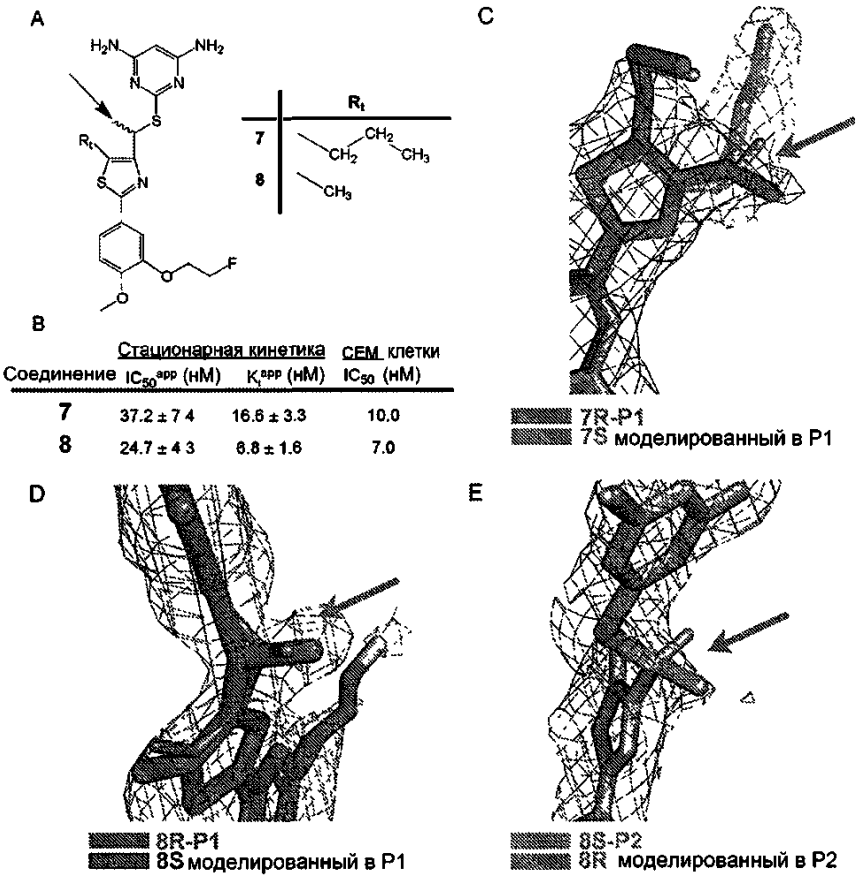


Фиг. 3



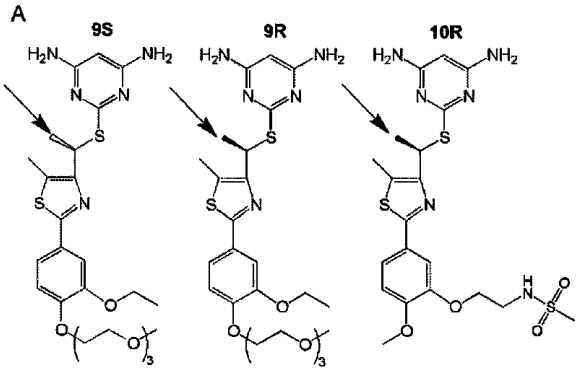
Соединение	Стационарная кинетика IC_{50}^{app} (нМ)	K_i^{app} (нМ)	СЕМ клетки IC_{50} (нМ)
5	16.8 ± 3.2	1.9 ± 0.4	11.6
6	17.9 ± 4.4	2.0 ± 0.6	0.9

Фиг. 4



Соединение	Стационарная кинетика IC_{50}^{app} (нМ)	K_i^{app} (нМ)	СЕМ клетки IC_{50} (нМ)
7	37.2 ± 7.4	16.6 ± 3.3	10.0
8	24.7 ± 4.3	6.8 ± 1.6	7.0

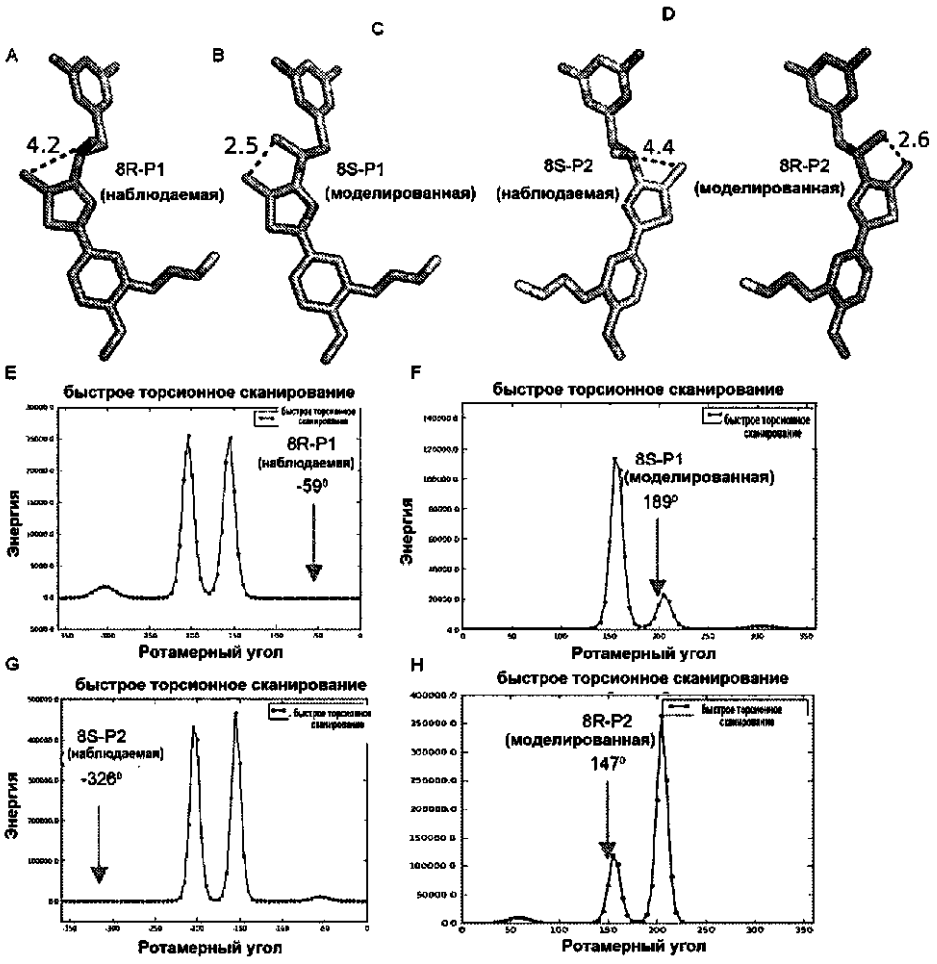
Фиг. 5



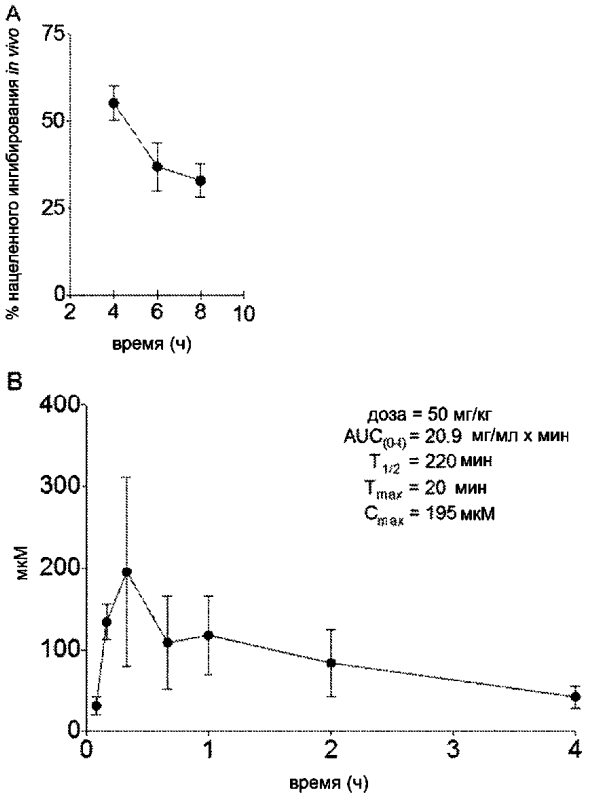
B

Соединение	Стационарная кинетика IC_{50}^{app} (нМ)	Стационарная кинетика K_i^{app} (нМ)	CEM клетки IC_{50} (нМ)	
9S	5632 ± 785	5607 ± 781		3.2 (R/S)
9R	31.7 ± 4.1	14.0 ± 1.5		
10S	605 ± 108	585 ± 104		4.5 (R/S)
10R	27.8 ± 3.5	9.2 ± 1.1		

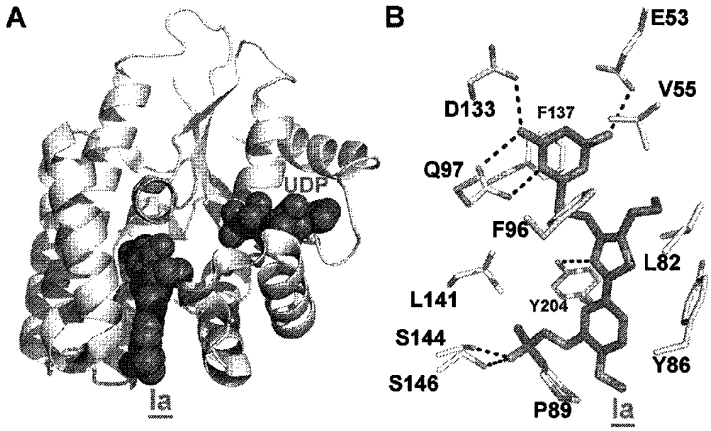
Фиг. 6



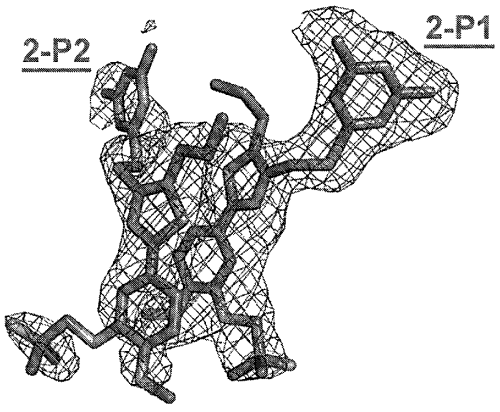
Фиг. 7



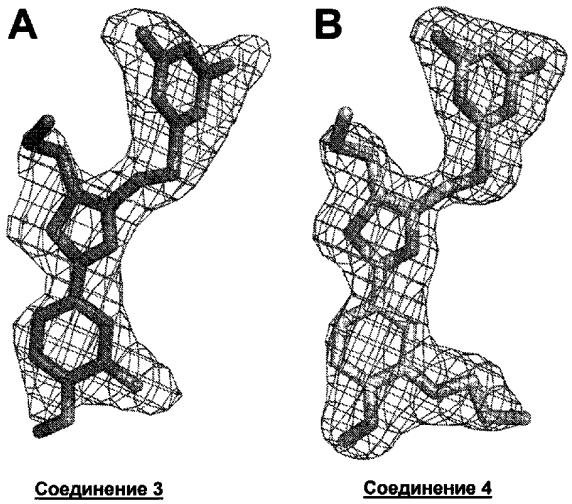
Фиг. 8



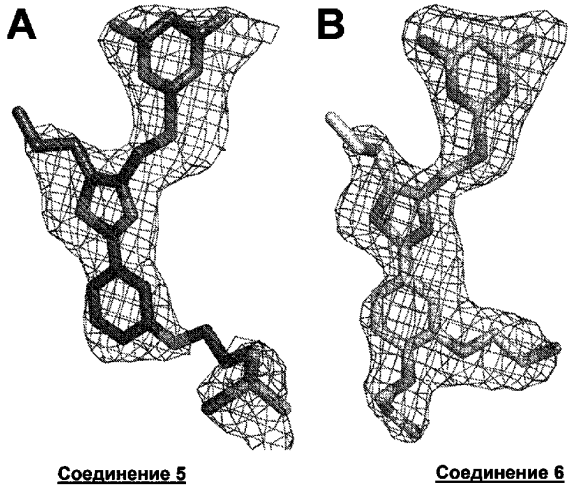
Фиг. 9



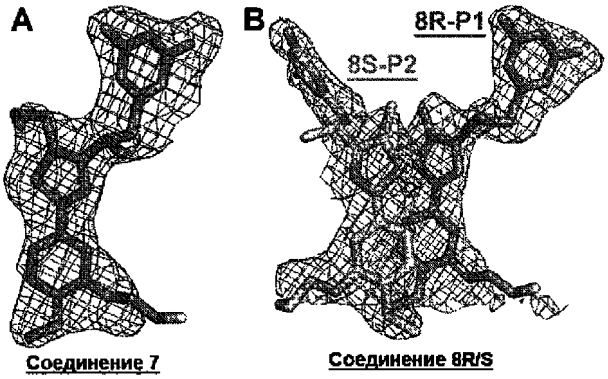
Фиг. 10



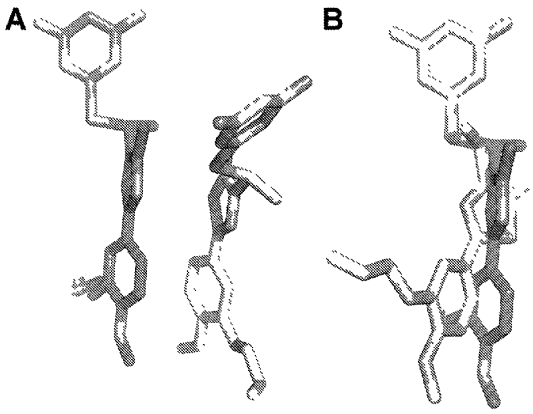
Фиг. 11



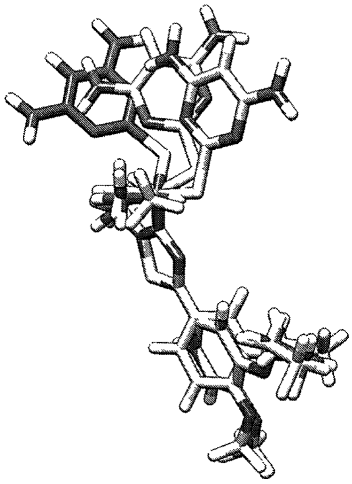
Фиг. 12



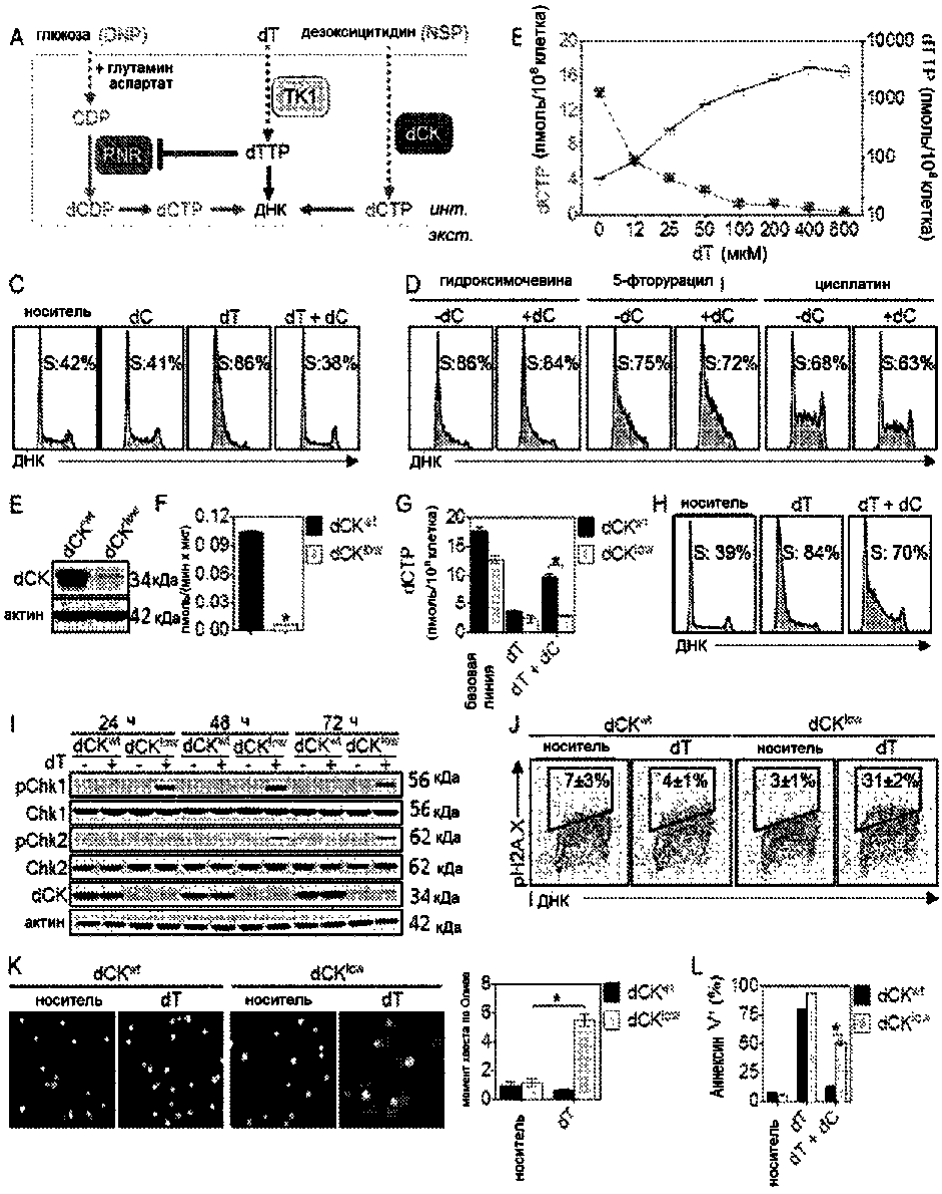
Фиг. 13



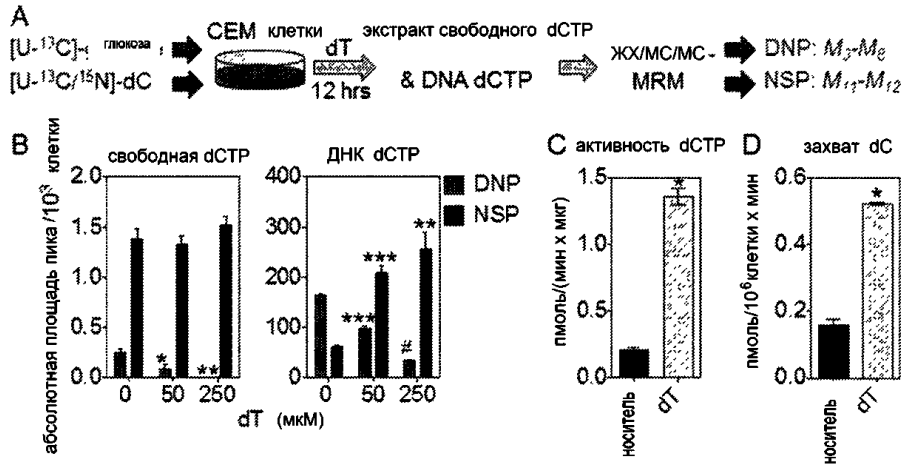
Фиг. 14



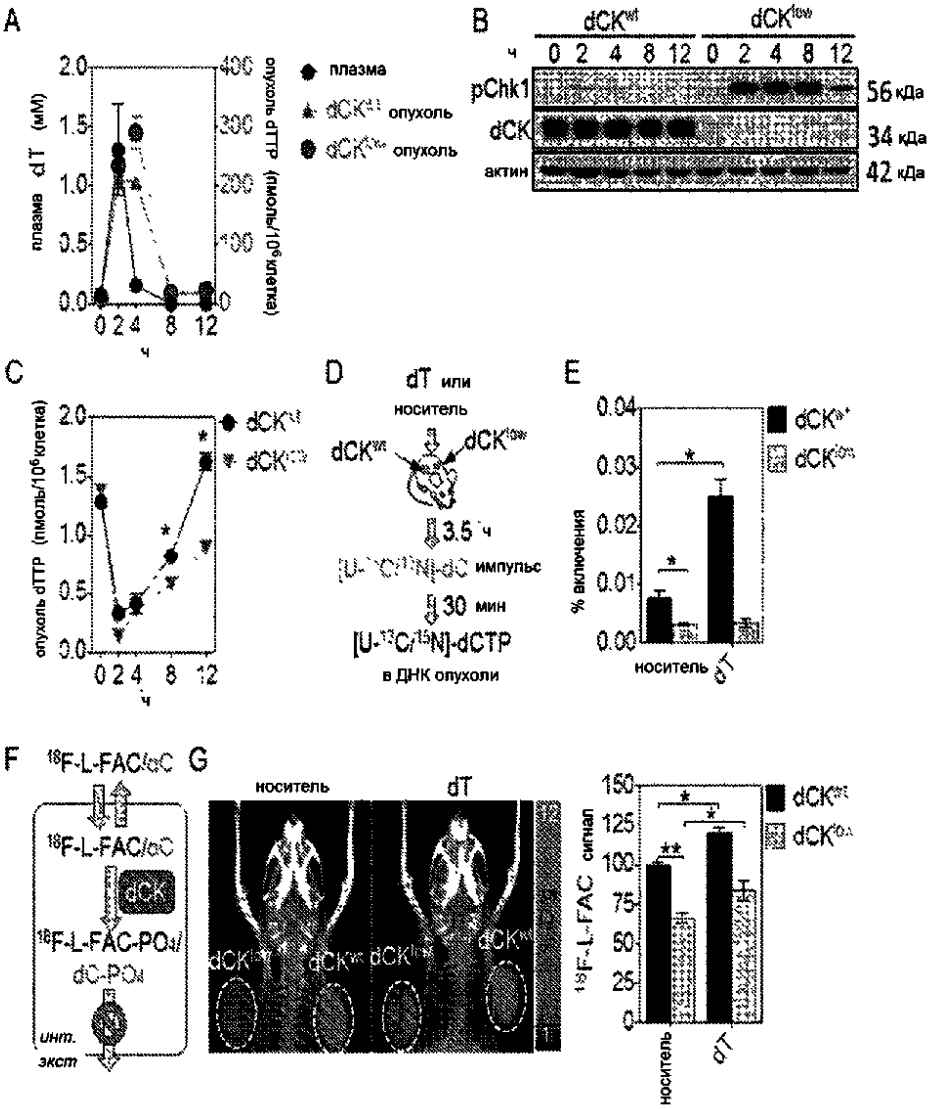
Фиг. 15


A
глюкоза (DNP)
dT
дезоксицитидин (NSP)
+ глутамин
аспартат
CDP
TK1
dCK
RNR
dTTP
dCDP
dCTP
ДНК
dCTP
инт.
экст.
E
dCTP (пмоль/10^6 клетка)
dT (мкМ)
C
носитель
dC
dT
dT + dC
S:42%
S:41%
S:86%
S:38%
ДНК
D
гидроксимочевина
5-фторурацил
цисплатин
-dC
+dC
S:86%
S:84%
S:75%
S:72%
S:68%
S:63%
E
dCK
актин
34 кДа
42 кДа
F
пмоль/(мин х мкг)
G
базовая линия
H
S: 39%
S: 84%
S: 70%
I
24 ч
48 ч
72 ч
pChk1
Chk1
pChk2
Chk2
56 кДа
62 кДа
J
7±3%
4±1%
3±1%
31±2%
pH2A.X
K
L
Аннексин V+ (%)

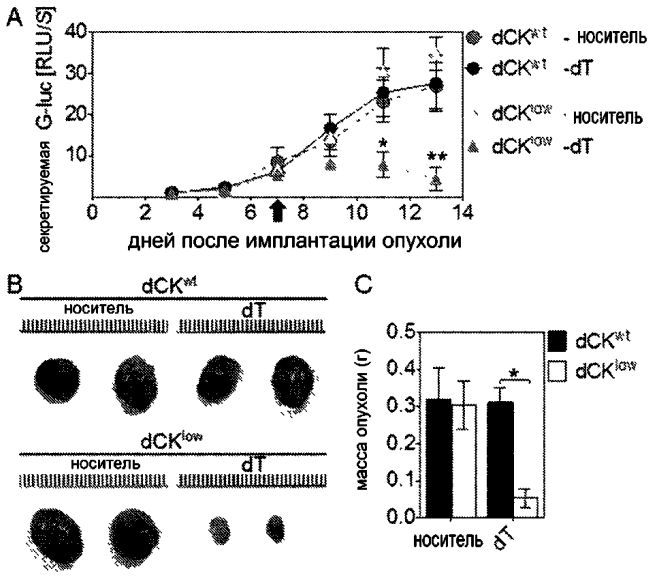
Фиг. 16


A
[U-13C]-глюкоза
[U-13C/15N]-dC
CEM клетки
dT
12 hrs
экстракт свободного dCTP
& DNA dCTP
ЖХ/МС/МС-MRM
DNP: M2-Me
NSP: M11-M12
B
свободная dCTP
ДНК dCTP
DNP
NSP
абсолютная площадь пика /10^3 клетки
dT (мкМ)
C активность dCTP
пмоль/(мин х мкг)
D захват dC
пмоль/10^6 клетки х мин
носитель
dT

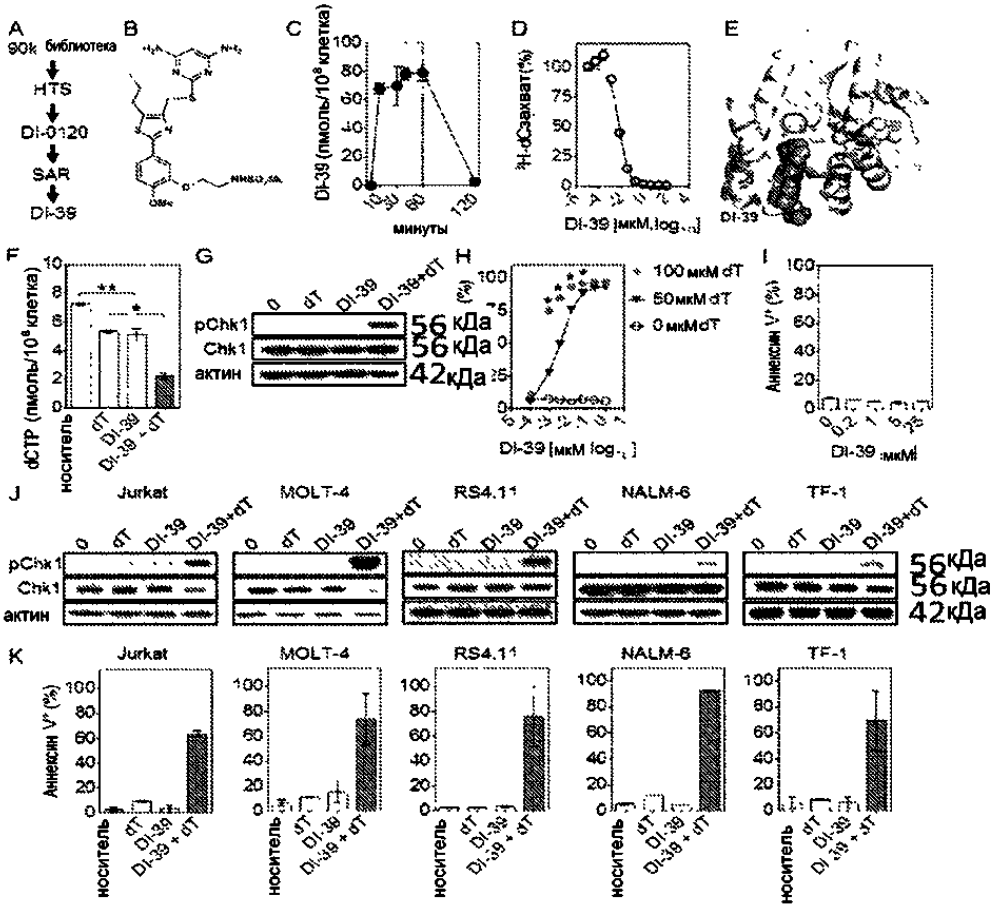
Фиг. 17


A
плазма dT (мМ)
опухоль dTTP (пмоль/10⁶клетка)
плазма
опухоль
опухоль
ч
B
dCK^wt
dCK^low
ч
0 2 4 8 12 0 2 4 8 12
pChk1
dCK
актин
56 кДа
34 кДа
42 кДа
C
опухоль dTTP (пмоль/10⁶клетка)
ч
D
dT или носитель
3.5 ч
импульс
30 мин
в ДНК опухоли
E
% включения
носитель
dT
F
G
носитель
dT
сигнал
носитель
dT

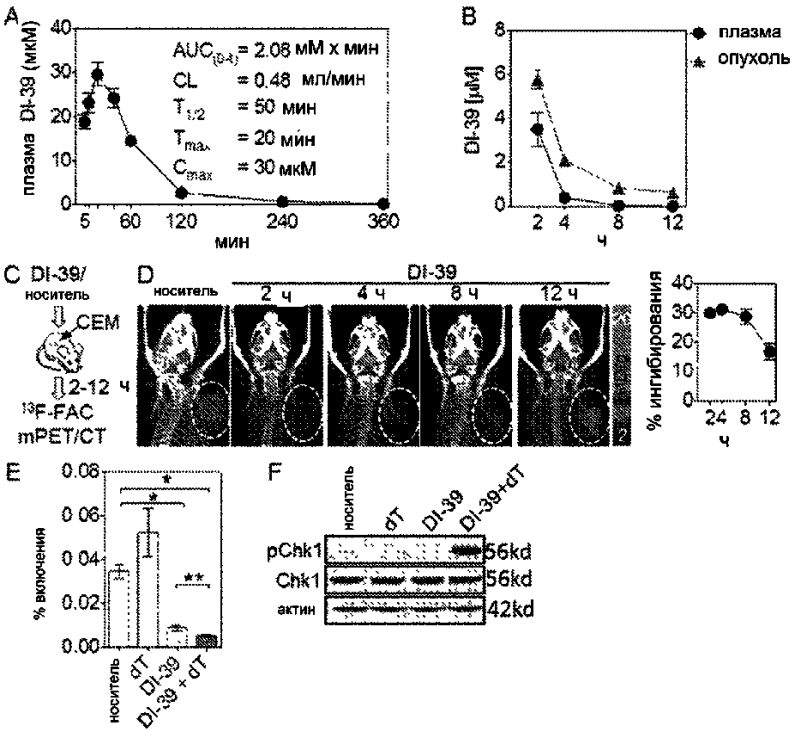
Фиг. 18


A
секретируемая G-luc [RLU/S]
- носитель
-dT
- носитель
-dT
дней после имплантации опухоли
B
носитель
dT
C
масса опухоли (г)
носитель
dT

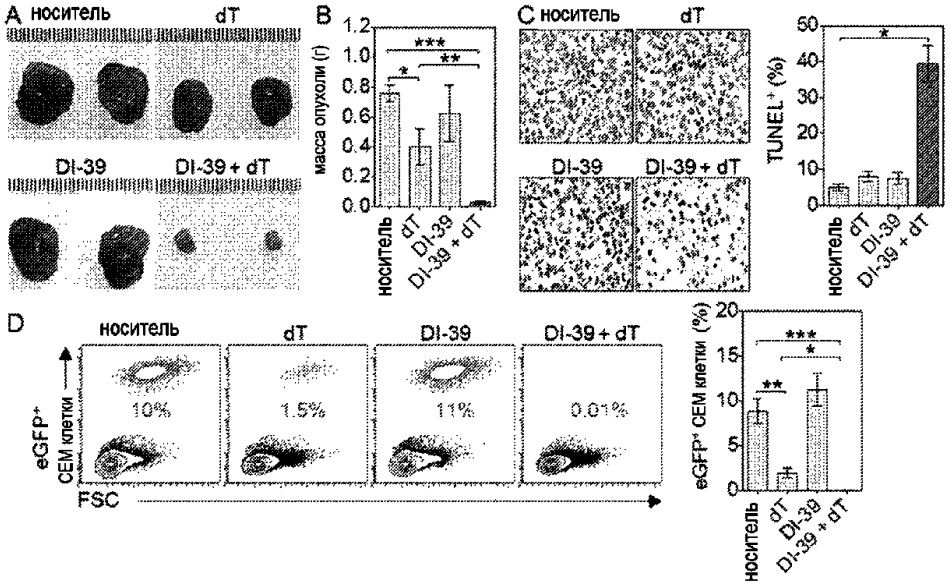
Фиг. 19


A
90k библиотека
HTS
DI-0120
SAR
DI-39
B
C
DI-39 (пмоль/10⁶ клетка)
минуты
D
³H-dC захват (%)
DI-39 [мкМ, log₁₀]
E
DI-39
F
dCTP (пмоль/10⁶ клетка)
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
G
0
dT
DI-39
DI-39+dT
pChk1
Chk1
актин
56 кДа
56 кДа
42кДа
H
(%)
100 мкМ dT
50 мкМ dT
0 мкМ dT
DI-39 [мкМ log₁₀]
I
Аннексин V⁺ (%)
DI-39 :мкМ
J
Jurkat
MOLT-4
RS4.11
NALM-6
TF-1
0
dT
DI-39
DI-39+dT
pChk1
Chk1
актин
56кДа
56кДа
42кДа
K
Jurkat
MOLT-4
RS4.11
NALM-6
TF-1
Аннексин V⁺ (%)
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT

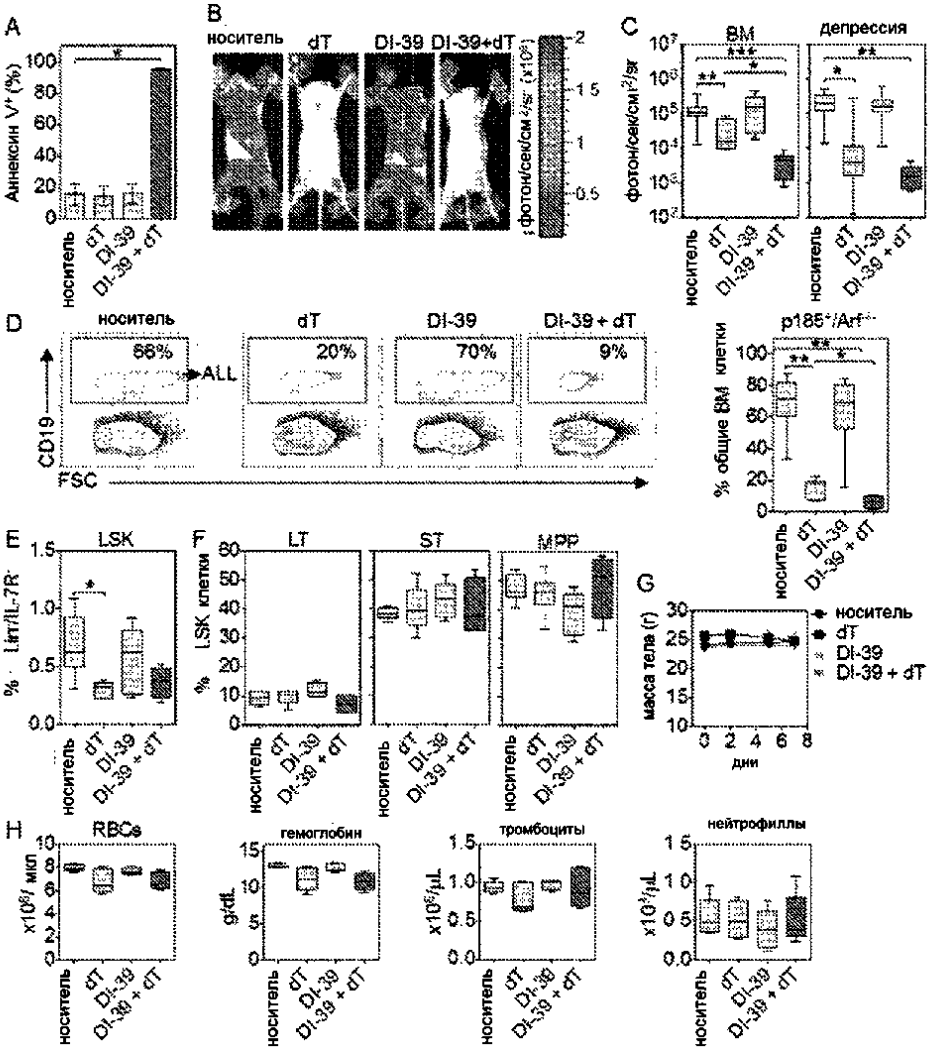
Фиг. 20


A
плазма DI-39 (мкМ)
AUC(0-t) = 2.08 мМ х мин
CL = 0.48 мл/мин
T1/2 = 50 мин
Tmax = 20 мин
Cmax = 30 мкМ
мин
B
DI-39 [μM]
плазма
опухоль
ч
C DI-39/
носитель
CEM
2-12 ч
18F-FAC
mPET/CT
D
носитель
DI-39
2 ч
4 ч
8 ч
12 ч
% ингибирования
ч
E
% включения
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
F
носитель
dT
DI-39
DI-39+dT
pChk1
Chk1
актин
56kd
56kd
42kd

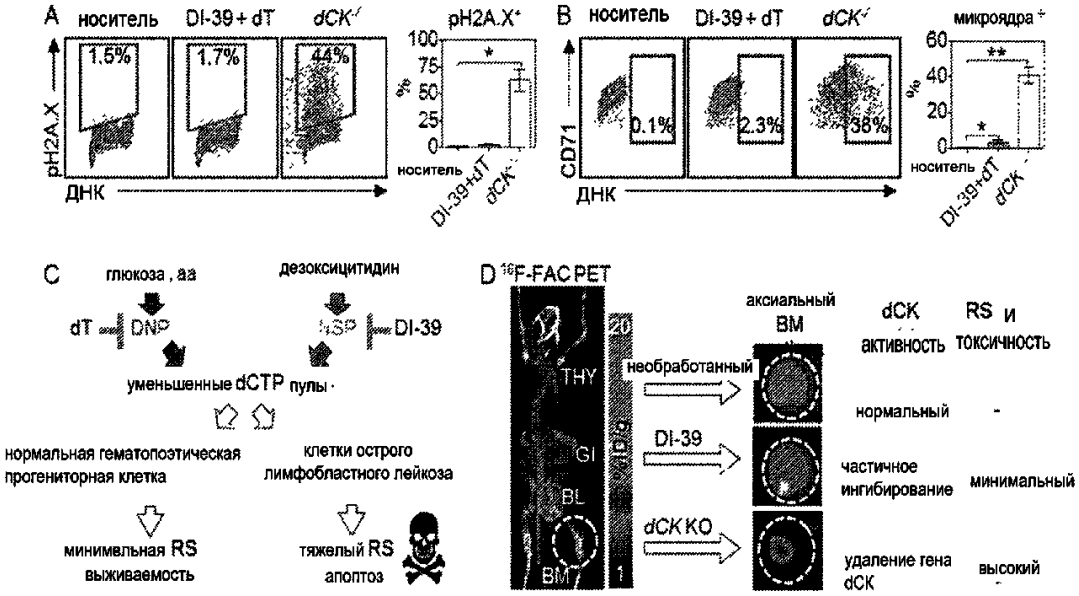
Фиг. 21


A носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
B
масса опухоли (г)
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
C носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
TUNEL+ (%)
D
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
10%
1.5%
11%
0.01%
eGFP+ CEM клетки
FSC
eGFP+ CEM клетки (%)

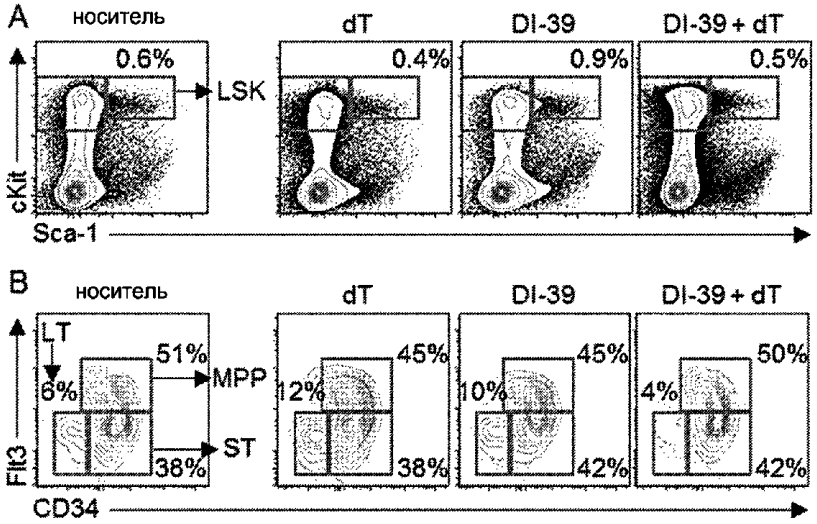
Фиг. 22


A
Аннексин V+ (%)
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
B
носитель
dT
DI-39
DI-39+dT
фотон/сек/см²/ср (x10⁶)
C
BM
депрессия
фотон/сек/см²/ср
D
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
66%
20%
70%
9%
ALL
CD19
FSC
p185+/Arf-/-
% общие BM клетки
E
LSK
% Lin-/IL-7R-
F
LT
ST
MPP
LSK клетки
G
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
масса тела (г)
дни
H
RBCs
гемоглобин
тромбоциты
нейтрофиллы

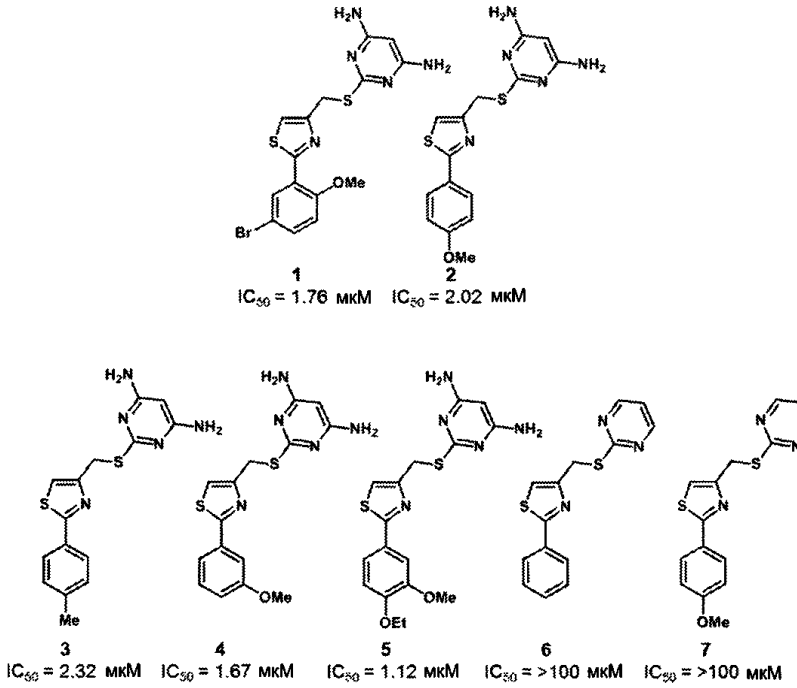
Фиг. 23


A
носитель
DI-39 + dT
dCK-/-
1.5%
1.7%
44%
pH2A.X
ДНК
pH2A.X+
100
75
50
25
0
%
носитель
DI-39+dT
dCK-/-
B
носитель
DI-39 + dT
dCK-/-
CD71
0.1%
2.3%
38%
ДНК
микроядра+
60
40
20
0
%
носитель
DI-39+dT
dCK-/-
C
глюкоза, аа
дезоксицитидин
dT
DNP
dCK
DI-39
уменьшенные dCTP пулы
нормальная гематопоэтическая прогениторная клетка
клетки острого лимфобластного лейкоза
минимальная RS выживаемость
тяжелый RS апоптоз
D 18F-FAC PET
THY
GI
BL
BM
20
10
1
аксиальный BM
необработанный
DI-39
dCK KO
dCK активность
RS и токсичность
нормальный
-
частичное ингибирование
минимальный
удаление гена dCK
высокий

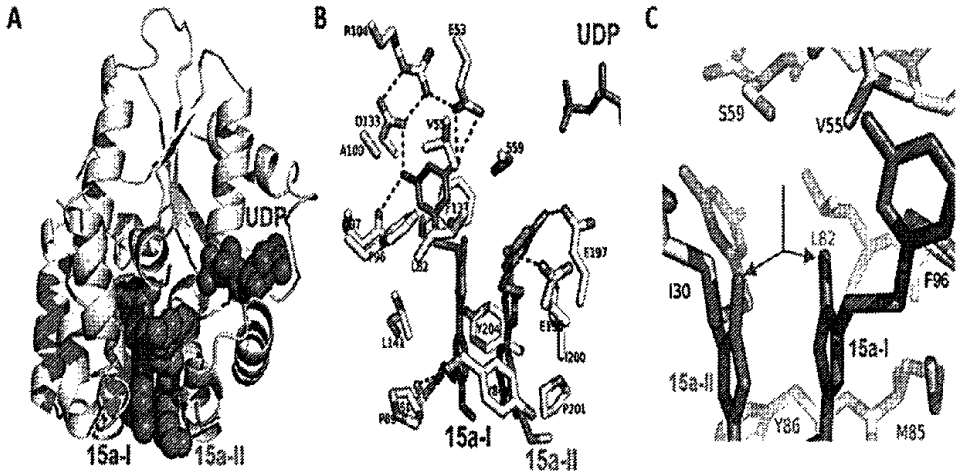
Фиг. 24


A
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
0.6%
0.4%
0.9%
0.5%
LSK
cKit
Sca-1
B
носитель
dT
DI-39
DI-39 + dT
LT
6%
51%
MPP
ST
38%
12%
45%
38%
10%
45%
42%
4%
50%
42%
Flt3
CD34

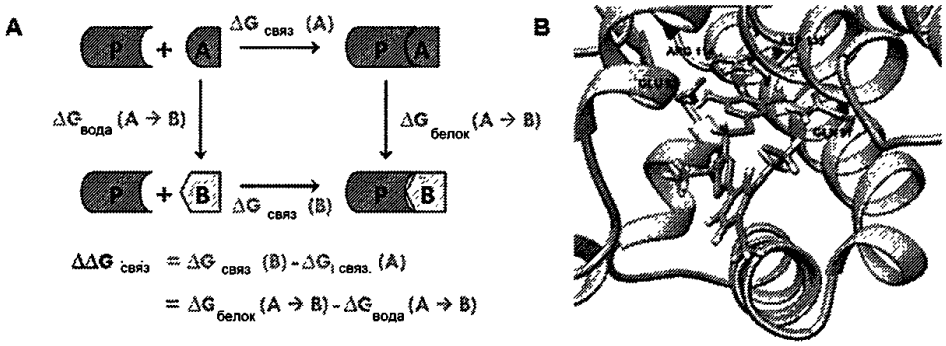
Фиг. 25


1
IC50 = 1.76 мкМ
2
IC50 = 2.02 мкМ
3
IC50 = 2.32 мкМ
4
IC50 = 1.67 мкМ
5
IC50 = 1.12 мкМ
6
IC50 = >100 мкМ
7
IC50 = >100 мкМ

Фиг. 26


A
UDP
15a-I
15a-II
B
UDP
15a-I
15a-II
C
S59
V55
I30
L62
F96
15a-I
15a-II
Y86
M85

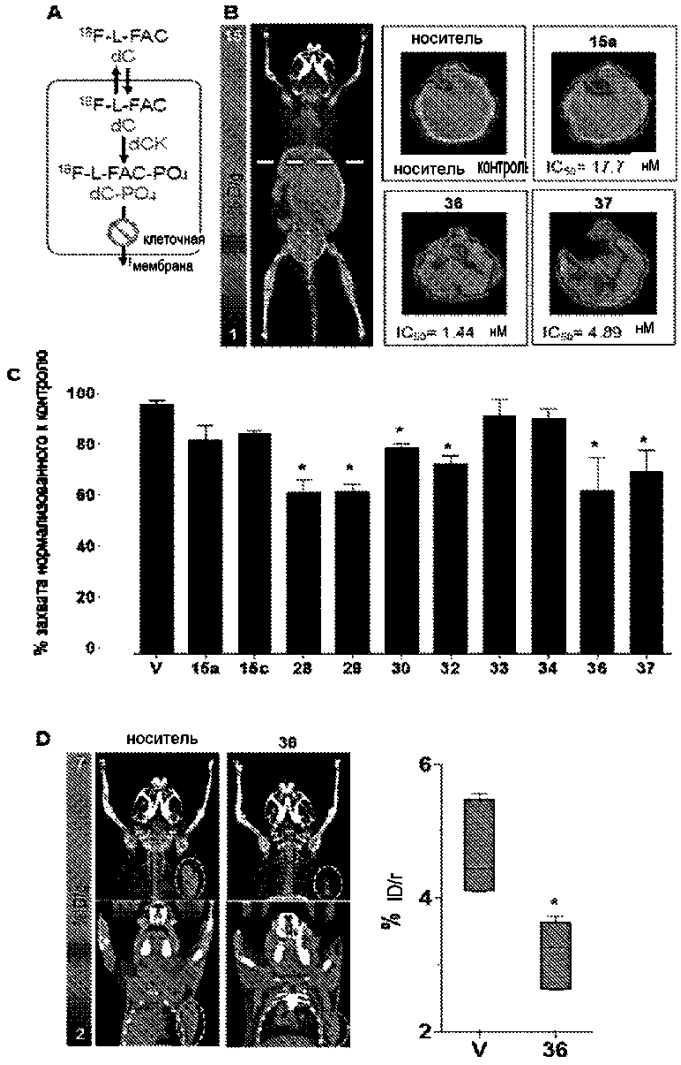
Фиг. 27



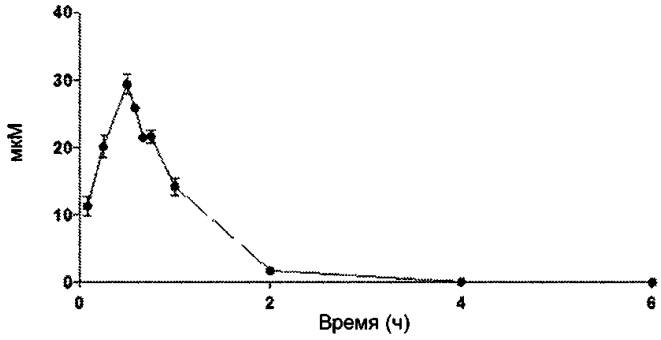
C

	$\Delta G_{белок}$	$\Delta G_{вода}$	$\Delta\Delta G_{связ.}$
15b - 15c	1.964 ± 0.050	2.802 ± 0.046	-0.838 ± 0.068
15c - 15b	-1.251 ± 0.029	-2.832 ± 0.046	1.581 ± 0.054
среднее значение			1.210 в пользу 15c

Фиг. 28

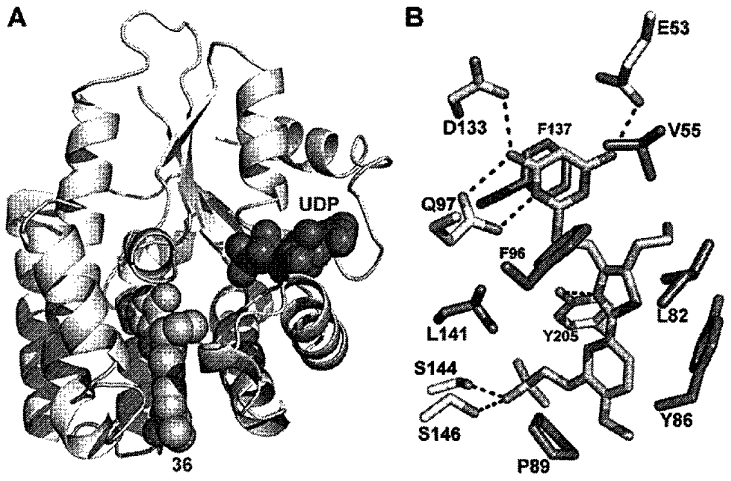


Фиг. 29



	Доза (мг/кг)	$AUC_{(0-t)}$ (мг/мл х мин)	$T_{1/2}$ (мин)	T_{max} (мин)	C_{max} (мкМ)
36	50	.832	30	30	30

Фиг. 30



Фиг. 31