

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038233**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.28

(21) Номер заявки
201992090

(22) Дата подачи заявки
2018.03.15

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ДЕЙТЕРИРОВАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИМИДАЗО[4,5-с]ХИНОЛИН-2-ОНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

(31) 62/472,080

(32) 2017.03.16

(33) US

(43) 2020.03.31

(86) PCT/EP2018/056516

(87) WO 2018/167203 2018.09.20

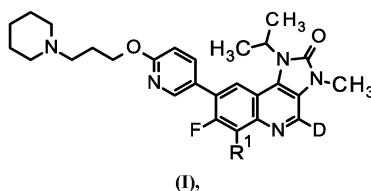
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АстраЗенека АБ (SE)

(56) WO-A1-2015170081
CN-A-102372711
CN-A-102399218
WO-A1-2017046216

(72) Изобретатель:
Пайк Курт Гордон, Барлаам Бернар
Кристоф (GB)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) Изобретение в общем относится к соединениям формулы (I)



и их фармацевтически приемлемым солям, где R¹ имеет значение, определенное в данном документе. Изобретение также относится к применению соединений формулы (I) и их солей для лечения или предотвращения заболеваний, опосредованных АТМ, включая рак. Описание дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим замещенные соединения имидазо[4,5-с]хинолин-2-она и их фармацевтически приемлемые соли; и к наборам, содержащим такие соединения и соли.

B1

038233

038233

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к дейтерированным соединениям имидазо[4,5-с]хинолин-2-она и их фармацевтически приемлемым солям. Данные соединения и соли селективно модулируют киназу мутации атаксии-телеангиэктазии ("АТМ"), и, таким образом, настоящее изобретение также относится к применению дейтерированных имидазо[4,5-с]хинолин-2-оновых соединений и их солей для лечения или предупреждения заболевания, опосредованного АТМ, включая рак. Описание дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим дейтерированные соединения имидазо[4,5-с]хинолин-2-она и их фармацевтически приемлемые соли; и к наборам, содержащим такие соединения и соли.

Предпосылки изобретения

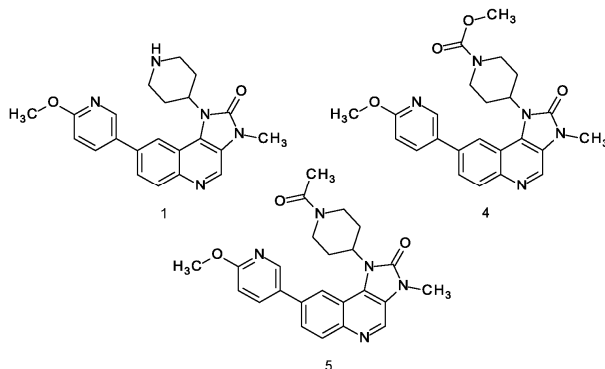
АТМ-киназа является серин/треонин киназой, которая изначально была идентифицирована как продукт гена, мутировавшего при атаксии-телеангиэктазии. Ген атаксии-телеангиэктазии расположен на хромосоме человека 11q22-23, он кодирует крупные белки размером примерно 350 кДа и характеризуется наличием домена фосфатидилинозитола ("PI") 3-киназосвязанной серин/треонин киназы, фланкированного доменами FRAP-АТМ-TRRAP и FATC, которые модулируют активность и функцию АТМ-киназы. Как выяснилось, АТМ-киназа играет основную роль в реакции на повреждение ДНК, вызванной двунитевым разрывом. Она в основном действует в S/G2/M-переходах клеточного цикла, и при остановленной репликации ее действие разветвляется на иницирование контрольных точек клеточного цикла, модификацию хроматина, направляемую гомологией репарацию и сигнальные каскады, способствующие выживанию, с целью поддержания целостности клетки после повреждения ДНК (Lavin, M.F.; Rev. Mol. Cell Biol. 2008, 759-769).

Сигнальную функцию АТМ-киназы можно в целом разделить на две категории: канонический путь, который обеспечивает передачу сигнала вместе с комплексом Mre11-Rad50-NBS1 от двунитевого разрыва и активирует контрольную точку повреждения ДНК, и несколько неканонических режимов активации, которые активируются другими формами клеточного стресса (Cremona et al., Oncogene 2013, 3351-3360).

АТМ-киназа быстро и энергично активируется в ответ на двунитевые разрывы, и сообщается, что она способна фосфорилировать свыше 800 субстратов (Matsuoka et al., Science, 2007, 1160-1166), координируя многочисленные пути реагирования на стресс (Kurz and Lees Miller, DNA Repair, 2004, 889-900). АТМ-киназа в основном находится в ядре клетки в неактивной гомодимерной форме, но она фосфорилирует сама себя по Ser1981 при распознавании двунитевого разрыва ДНК (канонический путь), что ведет к диссоциации до мономера, обладающего полной активностью киназы (Bakkenist et al., Nature, 2003, 499-506). Это - критическое событие активации, и вследствие этого АТМ фосфо-Ser1981 является как прямым фармакодинамическим параметром, так и биомаркером отбора пациентов с точки зрения зависимости сигнальных путей опухоли.

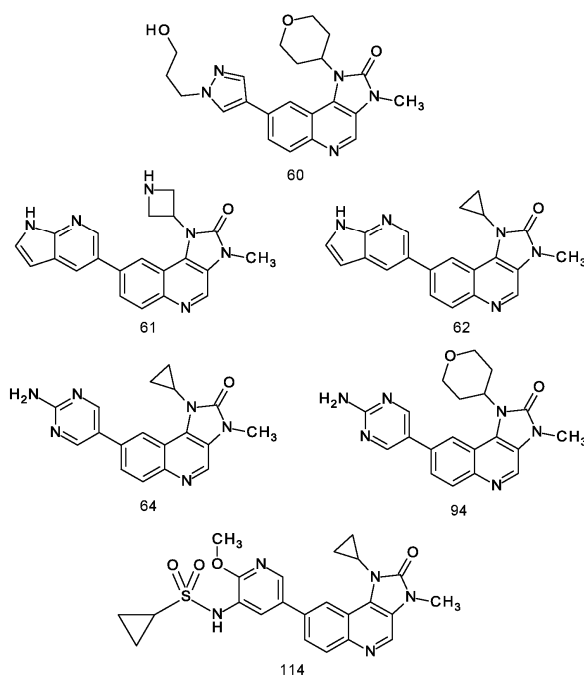
АТМ-киназа реагирует на прямые двунитевые разрывы, вызванные обычными противораковыми терапиями, такими как ионизирующее излучение и ингибиторы топоизомеразы-II (доксорубин, этопозид), а также ингибиторы топоизомеразы-I (например, иринотекан и топотекан) путем преобразования одонитевого разрыва в двунитевый разрыв во время репликации. Ингибирование АТМ-киназы может усилить действие любого из этих агентов, поэтому ожидается, что ингибиторы АТМ-киназы могут быть полезны в лечении рака.

В CN 102372711 А сообщается, что некоторые упоминаемые соединения имидазо[4,5-с]хинолин-2-она являются двойными ингибиторами PI3-киназы α и киназы мишени рапамицина в клетках млекопитающих ("mTOR"). Следующие соединения есть среди тех, которые упоминаются в CN 102372711 А:



Некоторые соединения, упоминаемые в CN 10237271 1А:

В CN 102399218 А сообщается о том, что некоторые упоминаемые соединения имидазо[4,5-с]хинолин-2-она являются ингибиторами PI3-киназы α . Следующие соединения есть среди тех, которые упоминаются в CN 102399218 А:



Некоторые соединения, упоминаемые в CN 102399218 A.

Несмотря на то что о соединениях из CN 102372711 A и CN 102399218 A сообщается, что они обладают действием против PI3-киназы α , а в некоторых случаях и против киназы mTOR, по-прежнему существует потребность в новых соединениях, которые будут более эффективны против различных киназ-ферментов, таких как АТМ-киназа. Кроме того, существует потребность в новых соединениях, которые будут действовать против определенных киназ-ферментов, таких как АТМ-киназа, высоко-селективным образом (т.е. путем более эффективного модулирования АТМ по сравнению с другими биологическими мишенями).

Как продемонстрировано в других разделах данного описания (например, в клеточном анализе, описываемого в экспериментальном разделе), соединения данного изобретения в общем обладают очень сильным ингибирующим АТМ-киназу действием, но значительно менее активны против других тирозинкиназных ферментов, таких как PI3-киназа α , mTOR-киназа и киназа атаксии-телеангиэктазии и Rad3-родственного белка ("ATR"). Как таковые соединения настоящего изобретения не только ингибируют АТМ-киназу, но могут рассматриваться как высокоселективные ингибиторы АТМ-киназы.

Ожидается, что благодаря своей высокой селективной способности соединения настоящего изобретения будут особенно полезны в лечении заболеваний, в которых задействована АТМ-киназа (например, в лечении рака), но при этом желательно, чтобы нецелелевое действие или токсичность, которые могут возникать вследствие подавления других тирозинкиназных ферментов, таких как PI3-киназа α , mTOR-киназа and ATR-киназа, было минимальным.

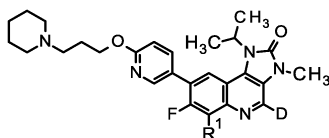
Желательно, чтобы лекарственные соединения обладали фармакокинетическими свойствами, которые обеспечивают их дозирование пациентам при переносимых уровнях. Плохие фармакокинетические свойства могут обуславливать неудовлетворительный результат кандидатных лекарственных средств в клиническом исследовании. Примером плохих фармакокинетических свойств является быстрый метаболизм, который может вызывать быстрое выведение лекарственного средства из организма, уменьшая таким образом его терапевтическую пользу. Хотя может быть возможным преодоление быстрого выведения лекарственного средства с помощью более частого введения доз лекарственного средства или введения его в более высоких дозах, такие подходы могут уменьшать соблюдение пациентом предписаний и/или подвергать пациентов риску усиления побочных эффектов. Другой подход к решению проблем быстрого метаболизма заключается в замещении одного или нескольких атомов водорода, связанных с углеродом, в молекуле лекарственного средства дейтерием (A.B. Foster, Trends in Pharmacological Sciences, 1984 (5), 524-527). По сравнению с водородом дейтерий образует более сильную связь с углеродом, и в некоторых случаях увеличенная стабильность связей может влиять на фармакокинетические свойства лекарственного средства, например, с помощью замедления определенных путей его метаболизма. Замещение одного или нескольких атомов водорода, связанных с углеродом, в молекуле лекарственного средства дейтерием оказывает незначительный стерический эффект, и поэтому не ожидается, что замена водорода дейтерием повлияет на биологическую активность лекарственного средства по сравнению с его недейтерированным эквивалентом. Однако на сегодняшний день одобрен только небольшой процент дейтерированных лекарственных средств, и влияние модификации дейтерия на фармакокинетические свойства лекарственного средства непредсказуемо, даже если атомы дейтерия включены

в известные участки метаболизма.

Ожидается, что соединения по настоящему изобретению демонстрируют фармакокинетические свойства, которые будут характерны для профиля, подходящего для введения пациентам.

Краткое описание изобретения

В одновременно рассматриваемой заявке РСТ/ЕР2016/071782 описаны замещенные соединения имидазо[4,5-с]хинолин-2-она, которые являются селективными модуляторами АТМ-киназы; при этом производные этих модуляторов описаны в данном документе. Вкратце, настоящее описание относится, помимо прочего, к соединению формулы (I)



(I),

или его фармацевтически приемлемой соли,

где R^1 представляет собой H или D.

В этом документе, в частности, также описана фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В настоящем документе, в частности, также описано соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

В настоящем документе, в частности, также описано соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака.

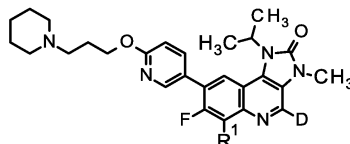
В настоящем документе, в частности, также описано применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

В настоящем документе, в частности, также описан способ лечения рака у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает в себя введение указанному теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

Многие варианты осуществления данного изобретения подробно представлены в описании и будут понятны читателю-специалисту в данной области техники. Не предполагается, что данное изобретение ограничивается каким(и)-либо определенным(и) вариантом(ами) его осуществления.

В первом варианте осуществления предложено соединение формулы (I)



(I),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где R^1 представляет собой H или D.

Группа "гидро" или "H" эквивалентна атому водорода. Атомы, к которым присоединены водородные группы, можно рассматривать как незамещенные.

Подразумевается, что в соединениях формулы (I), описанных в данном документе, в положении, конкретно обозначенном как "D" или "дейтерий", дейтерий присутствует в количестве, которое по меньшей мере в 3000 раз превышает естественное содержание дейтерия, которое составляет 0,015% (т.е. по меньшей мере 45% включение дейтерия). В других вариантах осуществления соединения формулы (I) характеризуются коэффициентом изотопного обогащения для каждого обозначенного атома дейтерия, составляющим по меньшей мере 3500 (52,5% включение дейтерия при каждом обозначенном атоме дейтерия), по меньшей мере 4000 (60% включение дейтерия), по меньшей мере 4500 (67,5% включение дейтерия), по меньшей мере 5000 (75% дейтерия), по меньшей мере 5500 (82,5% включение дейтерия), по меньшей мере 6000 (90% включение дейтерия), по меньшей мере 6333,3 (95% включение дейтерия), по меньшей мере 6466,7 (97% включение дейтерия), по меньшей мере 6600 (99% включение дейтерия) или по меньшей мере 6633,3 (99,5% включение дейтерия). Например, соединения формулы (I) могут характеризоваться коэффициентом изотопного обогащения для каждого обозначенного атома дейтерия, составляющим по меньшей мере 6466,7 (97% включение дейтерия). Включение дейтерия можно измерить с помощью методик, известных из уровня техники, таких как ^1H ЯМР-спектроскопия.

Термин "фармацевтически приемлемый" применяется для указания того, что объект (например, соль, лекарственная форма или вспомогательное вещество) подходит для применения пациентами. Перечень примеров фармацевтически приемлемых солей можно найти в Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth, editors, Weinheim/Zurich:Wiley-VCH/VHCA,

2002. Подходящей фармацевтически приемлемой солью соединения формулы (I) является, например, соль присоединения кислоты. Соль присоединения кислоты соединения формулы (I) может быть образована посредством приведения соединения в контакт с подходящей неорганической или органической кислотой в условиях, известных специалисту. Например, соль присоединения кислоты может быть образована с применением неорганической кислоты, выбранной из группы, состоящей из хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты и фосфорной кислоты. Соль присоединения кислоты также может быть образована с применением органической кислоты, выбранной из группы, состоящей из трифторуксусной кислоты, лимонной кислоты, малеиновой кислоты, щавелевой кислоты, уксусной кислоты, муравьиной кислоты, бензойной кислоты, фумаровой кислоты, янтарной кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, пировиноградной кислоты, метансульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты и пара-толуолсульфоновой кислоты.

Поэтому в одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, трифторуксусной кислоты, лимонной кислоты, малеиновой кислоты, щавелевой кислоты, уксусной кислоты, муравьиной кислоты, бензойной кислоты, фумаровой кислоты, янтарной кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, пировиноградной кислоты, метансульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты или пара-толуолсульфоновой кислоты. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль метансульфоновой кислоты. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой моно-соль метансульфоновой кислоты, т. е. стехиометрическое соотношение соединения формулы (I) к метансульфоновой кислоте в соединении составляет 1:1.

В одном варианте осуществления предусмотрен 4,6-дидейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте осуществления предусмотрен 4,6-дидейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтически приемлемая соль 4,6-дидейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-она.

В одном варианте осуществления предусмотрен 4-дейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте осуществления предусмотрен 4-дейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтически приемлемая соль 4-дейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-она.

Соединения и соли, описываемые в этом документе, могут находиться в сольватированных формах и несольватированных формах. Например, сольватированная форма может представлять собой гидратированную форму, такую как полугидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат или его альтернативное количество. Изобретение охватывает все такие сольватированные и несольватированные формы соединений формулы (I), в частности, в той степени, в которой такие формы обладают ингибирующей АТМ-киназу активностью, например, измеренной с использованием описываемых здесь испытаний.

Атомы соединений и солей, описываемых в этом изобретении, могут существовать в виде их изотопов. Изобретение охватывает все соединения формулы (I), где любой атом замещен одним или несколькими своими изотопами (например, соединение формулы (I), где один или несколько атомов углерода представляют собой изотоп углерода ^{11}C или ^{13}C , или где один или несколько атомов водорода представляют собой изотоп H или D).

Соединения и соли, описываемые в этом изобретении, могут находиться в виде смеси таутомеров. "Таутомеры" - это структурные изомеры, которые находятся в равновесии в результате переноса подвижного атома водорода. Изобретение охватывает все таутомеры соединений формулы (I), в частности, в той степени, в которой такие таутомеры обладают ингибирующей АТМ-киназу активностью.

Соединения и соли, описываемые в этом изобретении, могут быть кристаллическими и могут иметь одну или несколько кристаллических форм. Изобретение охватывает любые кристаллические или аморфные формы соединения формулы (I) или смесь таких форм, которые обладают ингибирующей АТМ-киназу активностью.

Общеизвестно, что кристаллические материалы могут быть охарактеризованы с использованием обычных методик, таких как порошковая рентгеновская дифракция (XRPD), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), термический гравиметрический анализ (TGA), инфракрасная спектроскопия диффузного отражения с Фурье-преобразованием (DRIFT), спектроскопия в ближней инфракрасной области (NIR), растворная и/или твердотельная спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Содержание воды в кристаллических материалах может быть определено методом Карла Фишера.

Вследствие их ингибирующего АТМ-киназу действия предполагается, что соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли будут полезны для терапии, например в лечении заболеваний или медицинских состояний, опосредованных, по меньшей мере частично, АТМ-киназой, включая рак.

Если упоминается "рак", то это включает в себя как нематастатический рак, так и метастатический рак, и, таким образом, лечение рака включает лечение как первичных опухолей, так и метастазов опухолей.

"Ингибирующее/ая действие/активность АТМ-киназы" относится к снижению активности АТМ-киназы вследствие прямого или косвенного ответа на присутствие соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по сравнению с активностью АТМ-киназы в отсутствие соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. Такое снижение активности может происходить благодаря непосредственному взаимодействию соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли с АТМ-киназой или благодаря воздействию соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли на один или несколько других факторов, которые, в свою очередь, влияют на активность АТМ-киназы. Например, соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль может снижать уровень АТМ-киназы путем непосредственного связывания с АТМ-киназой, путем влияния (непосредственного или косвенного) на другой фактор, вынуждая его снижать активность АТМ-киназы, или путем (непосредственного или косвенного) уменьшения количества АТМ-киназы, присутствующей в клетке или организме.

Термин "терапия" предназначен для обозначения своего обычного значения, когда он касается заболевания, для полного или частичного ослабления одного, нескольких или всех его симптомов или для устранения или купирования лежащей в основе патологии. Термин "терапия" также включает термин "профилактика", если нет конкретных указаний об обратном. Термины "терапевтический" и "терапевтически" должны интерпретироваться соответствующим образом.

Термин "профилактика" предназначен для обозначения своего обычного значения и включает первичную профилактику для предупреждения развития заболевания и вторичную профилактику, при которой заболевание уже развилось и пациент временно или постоянно защищен от обострения заболевания, или ухудшения заболевания, или развития новых симптомов, ассоциированных с заболеванием.

Термин "лечение" применяют как синоним "терапии". Подобным образом термин "лечить" можно рассматривать в качестве "применения терапии", где "терапия" определена в данном документе.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

В одном варианте осуществления предложено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного препарата.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении болезни, опосредованной АТМ-киназой. В одном варианте осуществления указанное заболевание, опосредованное АТМ-киназой, является раком. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, мелкоклеточного рака легкого и немелкоклеточного рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак представляет собой колоректальный рак.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления представлены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении болезни Хантингтона.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в качестве нейропротекторного средства.

"Нейропротекторное средство" - это средство, которое способствует относительной сохранности нейронной структуры и/или функции.

В одном варианте осуществления предложено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата для лечения заболевания, опосредованного АТМ-киназой. В одном варианте осуществления указанное заболевание, опосредованное АТМ-киназой, является раком. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, мелкоклеточного рака легкого и немелкоклеточного рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, плоскокле-

точной карциномы головы и шеи и рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак представляет собой колоректальный рак.

В одном варианте осуществления предложено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

В одном варианте осуществления предложено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного препарата для лечения болезни Хантингтона.

В одном варианте осуществления предложено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного препарата для применения в качестве нейропротекторного средства.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения заболевания, при котором ингибирование АТМ-киназы имеет благоприятное действие у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, причем способ включает в себя введение указанному теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления указанное заболевание представляет собой рак. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, мелкоклеточного рака легкого и немелкоклеточного рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак представляет собой колоректальный рак.

В любом варианте осуществления заболевание, при котором ингибирование АТМ-киназы имеет благоприятное действие, может быть болезнью Хантингтона.

В одном варианте осуществления предусмотрен способ лечения для способствования относительной сохранности нейронной структуры и/или функции у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает введение указанному теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения формулы (I), как описано в каком-либо из вариантов осуществления в данном документе, которое является эффективным для обеспечения "терапии" у субъекта или для "лечения" заболевания или расстройства у субъекта. В случае рака терапевтически эффективное количество может вызывать какое-либо из изменений, наблюдаемых или измеряемых у субъекта, как описано выше в определении "терапии", "лечения" и "профилактики". Например, эффективное количество может снижать количество раковых или опухолевых клеток; снижать общий размер опухоли; ингибировать или останавливать инфильтрацию опухолевых клеток в периферические органы, включая, например, мягкую ткань и кость; ингибировать и останавливать метастазы опухолей; ингибировать и останавливать рост опухолей; ослаблять до некоторой степени один или несколько симптомов, ассоциированных с раком; снижать тяжесть заболевания и смертность; улучшать качество жизни; или обеспечивать комбинацию таких действий. Эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для уменьшения симптомов заболевания, чувствительного к ингибированию активности АТМ-киназы. Для терапии рака эффективность *in vivo* можно измерять, например, с помощью оценки продолжительности поддержания жизнедеятельности, периода времени до прогрессирования заболевания (ТТР), значений частоты ответа (RR), продолжительности ответа и/или качества жизни. Как признается специалистами в данной области, эффективные количества могут изменяться в зависимости от пути введения, используемого вспомогательного вещества и совместного применения других лекарственных средств. Например, если применяют комбинированную терапию, объединенное вместе количество соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, описываемых в настоящем изобретении, с количеством другого(других) фармацевтически активного(активных) средства(средств) эффективно для лечения целевого нарушения у пациента-животного. В данном контексте объединенные количества представляют собой "терапевтически эффективное количество", если при объединении их достаточно для снижения интенсивности симптомов заболевания, чувствительного к ингибированию активности АТМ-киназы, как описано выше. Как правило, такие количества могут быть определены специалистом в данной области техники, например, исходя из диапазона доз, описываемого в настоящем изобретении для соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, и утвержденного(утвержденных) или иным способом опубликованного(опубликованных) диапазона(диапазонов) доз другого(других) фармацевтически активного(активных) соединения(соединений).

Понятие "теплокровных животных" включает в себя, например, людей.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения рака у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает в себя введение указанному теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой

соли. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, мелкоклеточного рака легкого и немелкоклеточного рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака легкого. В одном варианте осуществления указанный рак представляет собой колоректальный рак.

В любом варианте осуществления, где упоминается общий случай рака, указанный рак может быть выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, мелкоклеточного рака легкого и немелкоклеточного рака легкого. Указанный рак также может быть выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака легкого.

К любому варианту осуществления, где упоминается общий случай рака, могут относиться следующие варианты осуществления:

В одном варианте осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

В одном варианте осуществления рак представляет собой глиобластому.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак желудка.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак пищевода.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак яичника.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак эндометрия.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак шейки матки.

В одном варианте осуществления рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

В одном варианте осуществления рак представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз.

В одном варианте осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

В одном из вариантов осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы. Согласно одному варианту осуществления рак представляет собой рак молочной железы с тройным негативным фенотипом.

"Рак молочной железы с тройным негативным фенотипом" представляет собой любой рак молочной железы, который не экспрессирует гены для рецептора эстрогена, рецептора прогестерона и Her2/neu.

В одном варианте осуществления рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого. В одном варианте осуществления рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого. В одном варианте осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В одном варианте осуществления рак представляет собой метастатический рак. В одном варианте осуществления метастатический рак содержит метастазы центральной нервной системы. В одном варианте осуществления метастазы центральной нервной системы содержат метастазы в мозге. В одном варианте осуществления метастазы центральной нервной системы содержат лептоменингеальные метастазы.

"Лептоменингеальные метастазы" встречаются при распространении раковой опухоли на мозговые оболочки, слои ткани, покрывающие головной мозг и спинной мозг. Метастазы могут распространяться в мозговые оболочки через кровь или они могут перемещаться из метастазов головного мозга, переносимых спинномозговой жидкостью (СМЖ), которая протекает через мозговые оболочки. В одном из вариантов осуществления рак представляет собой неметастатический рак.

Противораковое лечение, описываемое в этом изобретении, может быть полезно в виде монотерапии или может включать, в дополнение к введению соединения формулы (I), традиционное хирургическое вмешательство, лучевую терапию или химиотерапию или комбинацию таких дополнительных терапевтических лечений. Такие традиционные хирургическое вмешательство, лучевая терапия или химиотерапия могут применяться одновременно, последовательно или отдельно от лечения соединением формулы (I).

Лучевая терапия может включать одну или несколько из следующих категорий терапии:

i) наружная лучевая терапия, при которой используется электромагнитное излучение, и интраоперационная лучевая терапия, при которой используется электромагнитное излучение;

ii) внутренняя лучевая терапия или брахитерапия, включающая интерстициальную лучевую терапию или интралюминальную лучевую терапию; или

ные метастазы.

В любом варианте осуществления лучевую терапию выбирают из группы, состоящей из одной или нескольких категорий радиотерапии, перечисленных под пунктами (i) - (iii) выше.

Химиотерапия может включать одну или несколько из следующих категорий противоопухолевых веществ.

(i) Противоопухолевые средства и их комбинации, такие как алкилирующие ДНК препараты (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, циклофосфамид, азотистые иприты, такие как ифосфамид, бендамустин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, темозоломид, и нитрозомочевина, такие как кармустин); антиметаболиты (например, гемцитабин и антифолаты, такие как фторпиримидины, как например, 5-фторурацил и тегафур, ралтитрексед, метотрексат, цитозин-арабинозид и гидроксимочевина); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины, такие как адриаамин, блеомицин, доксорубин, липосомный доксорубин, пирарубин, дауномицин, вальрубин, эпирубин, идарубин, митомицин-С, дактиномицин, амрубин и митрамицин); антимитотические средства (например, алкалоиды барвинка, как например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин, а также таксоиды, такие как таксол и таксотер, и ингибиторы полокиназы); и ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, такие как этопозид и тенипозид, амсакрин, иринотекан, топотекан и камптотецин); ингибиторы механизмов репарации ДНК, такие как киназа CHK; ингибиторы ДНК-зависимой протеинкиназы; ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ингибиторы PARP, в том числе олапариб); и ингибиторы Hsp90, такие как танеспимицин и ретаспимицин, ингибиторы ATR киназы (такие как AZD6738); и ингибиторы WEE1 киназы (такие как AZD1775/MK-1775).

(ii) Антиангиогенные средства, такие как антиангиогенные средства, ингибирующие воздействие фактора роста эндотелия сосудов, например, антитело к фактору роста клеток эндотелия сосудов бевацизумаб, и, например, ингибитор рецепторной тирозинкиназы VEGF, такой как вандетаниб (ZD6474), сорафениб, ваталаниб (PTK787), сунитиниб (SU11248), акситиниб (AG-013736), пазопаниб (GW 786034) и цедираниб (AZD2171), соединения, такие как соединения, раскрытые в международных патентных заявках WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 и WO 98/13354, и соединения с другими механизмами действия (например, линомид, ингибиторы функции интегрин $\alpha v \beta 3$ и ангиостатин), или ингибиторы ангиопоэтинов и их рецепторов (Tie-1 и Tie-2), ингибиторы PLGF, ингибиторы дельта-подобных лигандов (DLL-4).

(iii) Подходы к иммунотерапии, включая, например, подходы *ex vivo* и *in vivo* для повышения иммуногенности опухолевых клеток пациента, такие как трансфекция цитокинами, такими как интерлейкин 2, интерлейкин 4 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; подходы для снижения Т-клеточной анергии или функции регуляторных Т-клеток; подходы, которые обеспечивают усиление ответных реакций Т-клеток на опухоли, например, блокирующие антитела к CTLA4 (например, ипилимумаб и тремелиумаб), B7H1, PD-1 (например, BMS-936558 или AMP-514), PD-L1 (например, MEDI4736) и антитела-агонисты к CD137; подходы с применением трансфицированных иммунных клеток, таких как цитокин-трансфицированные дендритные клетки; подходы с применением цитокин-трансфицированных опухолевых клеточных линий; подходы с применением антител к антигенам, ассоциированным с опухолями, и антител, которые обеспечивают уменьшение количества типов целевых клеток (например, неконъюгированных антител к CD20, таких как ритуксимаб, меченых радиоактивным изотопом антител к CD20, бексар и зевалин, и антитела к CD54, кампат); подходы с применением антиидиотипических антител; подходы, которые обеспечивают усиление функции естественной клетки-киллера, и подходы, в которых используют конъюгаты антитело-токсин (например, антитело к CD33, милотарг); иммунотоксины, такие как моксетумумаб пасудотокс; агонисты toll-подобного рецептора 7 или toll-подобного рецептора 9;

(iv) Усилители эффективности действия, такие как лейковорин.

Поэтому в одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество для применения в лечении рака. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с дополнительным противоопухолевым веществом. В одном варианте осуществления присутствует одно дополнительное противоопухолевое вещество. В одном варианте осуществления присутствуют два дополнительных противоопухолевых вещества. В одном варианте осуществления присутствуют три или больше дополнительных противоопухолевых веществ.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество для применения в одновременном, раздельном или последовательном лечении рака. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно, раздельно или последовательно с дополнительным противоопухолевым веществом.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения рака у теплокровного животного, ну-

ждающегося в таком лечении, который включает в себя введение указанному теплокровному животному соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного дополнительного противоопухолевого вещества, где количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного противоопухолевого вещества вместе эффективно осуществляют противораковое действие.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения рака у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает в себя введение указанному теплокровному животному соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и одновременное, раздельное или последовательное введение по меньшей мере одного дополнительного противоопухолевого вещества указанному теплокровному животному, где количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного противоопухолевого вещества вместе эффективно осуществляют противораковое действие.

В любом варианте осуществления дополнительное противоопухолевое вещество выбирают из группы, состоящей из одного или нескольких противоопухолевых веществ, перечисленных под пунктами (i)-(iv) выше.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно антибластомное средство для применения в лечении рака. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации по меньшей мере с одним антибластомным средством. В одном варианте осуществления антибластомное средство выбирают из перечня антибластомных средств в пункте (i) выше.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно антибластомное средство для применения в одновременном, раздельном или последовательном лечении рака. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно, раздельно или последовательно с по меньшей мере одним антибластомным средством. В одном варианте осуществления антибластомное средство выбирают из перечня антибластомных средств в пункте (i) выше.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество, выбранное из группы, состоящей из цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина, вальрубицина, идарубицина, доксорубицина, пирарубицина, иринотекана, топотекана, амрубицина, эпирубицина, этопозиды, митомицина, бендамустина, хлорамбуцила, циклофосфамида, ифосфамида, кармустина, мелфалана, блеомицина, олапариба, MEDI4736, AZD1775 и AZD6738, для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество, выбранное из группы, состоящей из цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина, доксорубицина, пирарубицина, иринотекана, топотекана, амрубицина, эпирубицина, этопозиды, митомицина, бендамустина, хлорамбуцила, циклофосфамида, ифосфамида, кармустина, мелфалана, блеомицина, олапариба, AZD1775 и AZD6738, для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным противоопухолевым веществом, выбранным из группы, состоящей из цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина, вальрубицина, идарубицина, доксорубицина, пирарубицина, иринотекана, топотекана, амрубицина, эпирубицина, этопозиды, митомицина, бендамустина, хлорамбуцила, циклофосфамида, ифосфамида, кармустина, мелфалана, блеомицина, олапариба, MEDI4736, AZD1775 и AZD6738.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество, выбранное из группы, состоящей из доксорубицина, иринотекана, топотекана, этопозиды, митомицина, бендамустина, хлорамбуцила, циклофосфамида, ифосфамида, кармустина, мелфалана, блеомицина и олапариба, для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным противоопухолевым веществом, выбранным из группы, состоящей из доксорубицина, иринотекана, топотекана, этопозиды, митомицина, бендамустина, хлорамбуцила, циклофосфамида, ифосфамида, кармустина, мелфалана, блеомицина и олапариба.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество, выбранное из группы, состоящей из доксорубицина, иринотекана, топотекана, этопозиды, митомицина, бендамустина,

хлорамбуцила, циклофосфида, ифосфида, кармустина, мелфалана и блеомицина, для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным противоопухолевым веществом, выбранным из группы, состоящей из доксорубина, иринотекана, топотекана, этопозиды, митомицина, бендамустина, хлорамбуцила, циклофосфида, ифосфида, кармустина, мелфалана и блеомицина.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным противоопухолевым веществом, выбранным из группы, состоящей из доксорубина, пирарубина, амрубина и эпирубина. В одном варианте осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз. В одном варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы (например, рак молочной железы с тройным негативным фенотипом). В одном варианте осуществления рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и иринотекан для применения в лечении рака. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с иринотеканом. В одном варианте осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и FOLFIRI для применения в лечении рака. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с FOLFIRI. В одном варианте осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

FOLFIRI представляет собой режим дозирования, в котором используется комбинация лейковорина, 5-фторурацила и иринотекана.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с олапарибом. В одном варианте осуществления рак представляет собой рак желудка.

В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с топотеканом. В одном варианте осуществления рак представляет собой мелкоклочный рак легкого. В одном варианте осуществления предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с иммунотерапией. В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой одно или несколько из средств, перечисленных в пункте (iii) выше. В одном варианте осуществления иммунотерапия представляет собой анти-тело к PD-L1 (например, MEDI4736).

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления предложен набор, содержащий:

- a) соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль в первой стандартной лекарственной форме;
- b) дополнительное противоопухолевое вещество в дополнительной стандартной лекарственной форме;
- c) приспособление для вмещения указанных первой и дополнительной стандартных лекарственных форм; и необязательно
- d) инструкцию по применению.

В одном варианте осуществления противоопухолевое вещество содержит антибластомное средство.

В любом варианте осуществления, где упоминается антибластомное средство, антибластомное средство представляет собой одно или несколько средств, перечисленных в пункте (i) выше.

Соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли можно вводить в качестве фармацевтических композиций, содержащих одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Поэтому в одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Выбор вспомогательного(ых) вещества(в) для включения в определенную композицию будет зависеть от таких факторов, как способ введения и форма предоставленной композиции. Пригодные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества хорошо известны специалистам в данной области и описываются, например, в Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth edition, Pharmaceutical Press, edited

by Rowe, Ray C.; Sheskey, Paul J.; Quinn, Marian. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут действовать, например, как вспомогательные средства, разбавители, носители, стабилизаторы, ароматизаторы, красящие вещества, наполнители, связующие, разрыхлители, смазки, вещества, улучшающие скольжение, загустители и средства для нанесения покрытия. Как будет понятно специалисту в данной области, некоторые фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут выполнять больше чем одну функцию и могут выполнять альтернативные функции в зависимости от количества вспомогательного вещества в композиции и от того, какие еще вспомогательные вещества присутствуют в композиции.

Фармацевтические композиции могут быть в форме, подходящей для перорального применения (например, в виде таблеток, пастилок, твердых или мягких капсул, водных или масляных суспензий, эмульсий, диспергируемых порошков или гранул, сиропов или настоек), для местного применения (например, в виде кремов, мазей, гелей или водных или масляных растворов или суспензий), для введения путем ингаляции (например, в виде мелкодисперсного порошка или жидкого аэрозоля), для введения путем инсуффляции (например, в виде мелкодисперсного порошка) или для парентерального введения (например, в виде стерильного водного или масляного раствора для внутривенного, подкожного, внутримышечного или внутримышечного введения доз) или в виде суппозитория для ректального введения доз. Композиции можно получать с помощью традиционных процедур, хорошо известных из уровня техники. Композиции, предназначенные для перорального применения, могут содержать дополнительные компоненты, например одно или несколько красящих, подслащивающих, ароматизирующих и/или консервирующих средств.

Соединение формулы (I) будут обычно вводить теплокровному животному в однократной дозе в пределах от 2,5-5000 мг/м² площади поверхности тела животного или примерно 0,05-100 мг/кг, и данное количество обычно обеспечивает терапевтически эффективную дозу. Стандартная лекарственная форма, такая как таблетка или капсула, будет обычно содержать, например, 0,1-250 мг активного ингредиента. Суточная доза в обязательном порядке будет варьироваться в зависимости от получающего лечение субъекта, конкретного пути введения, каких-либо вводимых совместно терапий и тяжести заболевания, подлежащего лечению. Следовательно, практикующий врач, который лечит какого-либо конкретного пациента, может определить оптимальную дозу.

Фармацевтические композиции, описываемые в данном документе, содержат соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли и поэтому ожидается, что они будут полезны для терапевтического лечения.

По сути, в одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция для применения в терапии, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция для применения в терапевтическом лечении заболевания, при котором ингибирование АТМ-киназы имеет благоприятное действие, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, при котором ингибирование АТМ-киназы имеет благоприятное действие, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, рака яичника, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, мелкоклеточного рака легкого или немелкоклеточного рака легкого, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Примеры

Различные варианты осуществления изобретения проиллюстрированы следующими примерами. Не предполагается, что данное изобретение ограничивается этими примерами. В ходе подготовки примеров в общем осуществляли следующее.

(i) Операции проводили при температуре окружающей среды, т.е. в интервале примерно от 17 до 30°C и в атмосфере инертного газа, такого как азот, если не указано иное.

(ii) Выпаривание проводили путем ротационного испарения или с использованием оборудования Genevac in vacuo, а процедуры выделения продукта реакции проводили после удаления остаточных твердых веществ путем фильтрации.

(iii) Очистку с помощью флэш-хроматографии выполняли на автоматизированном Armen Glider

Flash: Spot II Ultimate (Armen Instrument, Saint-Ave, Франция) или на автоматизированном Presearch CombiFlash Companions, используя заранее упакованные нормальной фазой Si60 диоксида кремния картриджи производства Merck (гранулометрия: 15-40 или 40-63 мкм), полученные от Merck, Darmstad, Германия, картриджи с диоксидом кремния silicycle или картриджи с диоксидом кремния graceresolv.

(iv) Препаративную хроматографию выполняли на приборе Waters (600/2700 или 2525), оборудованном масс-спектрометром ZMD или ZQ ESCi и колонкой с обращенной фазой Waters X-Terra, или Waters X-Bridge, или Waters SunFire (C-18, диоксид кремния 5 мкм, диаметром 19 или 50 мм, длиной 100 мм, расход 40 мл/мин), используя смеси с уменьшающейся полярностью, состоящие из воды (содержащей 1% аммиака) и ацетонитрила, или смеси с уменьшающейся полярностью, состоящие из воды (содержащей 0,1% муравьиной кислоты) и ацетонитрила, в качестве элюентов.

(v) Выходы, если они присутствовали, необязательно были достижимым максимумом.

(vi) Структуры конечных продуктов, соответствующих формуле (I), подтверждали, используя спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР), измеряя величины химического сдвига ЯМР по дельта шкале. Спектры протонного магнитного резонанса определяли с использованием прибора Bruker advance 700 (700 МГц), Bruker Avance 500 (500 МГц), Bruker 400 (400 МГц) или Bruker 300 (300 МГц); ^{19}F ЯМР определяли при 282 или 376 МГц; ^{13}C ЯМР определяли при 75 или 100 МГц; измерения проводили при температуре в интервале приблизительно 20-30°C, если не указано иное; были использованы следующие сокращения: s, синглет; d, дублет; t, триплет; q, квартет; m, мультиплет; dd, дублет дублетов; ddd, дублет дублета дублетов; dt, дублет триплетов; bs, широкополосный сигнал;

(vii). Конечные продукты, соответствующие формуле (I), были также охарактеризованы с использованием масс-спектрометрии, а затем - жидкостной хроматографии (LCMS или ЖХ-МС); LCMS проводили, используя Waters Alliance HT (2790 & 2795), оснащенный масс-спектрометром Waters ZQ ESCi или ZMD ESCi и колонкой X Bridge 5 мкм C-18 (2,1×50 мм) с расходом 2,4 мл/мин, используя систему растворителей, содержащую от 95% A + 5% C до 95% B + 5% C за 4 мин, где A = вода, B = метанол, C = 1:1 метанол:вода (содержащая 0,2% карбоната аммония); или используя Shimadzu UFLC или UHPLC в сочетании с детектором DAD, детектором ELSD и масс-спектрометром 2020 EV (или эквивалентным ему), оснащенный колонкой Phenomenex Gemini-NX C18 3,0×50 мм, 3,0 мкм или эквивалентной ей (основные условия), или колонкой Shim pack XR - ODS 3,0×50 мм, 2,2 мкм, или колонкой Waters BEH C18 2,1×50 мм, 1,7 мкм, или эквивалентной ей, используя систему растворителей, содержащую от 95% D + 5% E до 95% E + 5% D за 4 мин, где D = вода (содержащая 0,05% TFA), E = ацетонитрил (содержащий 0,05% TFA) (кислотные условия), или систему растворителей, содержащую от 90% F + 10% G до 95% G + 5% F за 4 мин, где F = вода (содержащая 6,5 мМ бикарбоната аммония с рН, доведенным до 10 добавлением аммиака), G = ацетонитрил (основные условия).

(viii) Промежуточные соединения в общем полностью не охарактеризовывали и их чистоту оценивали с помощью тонкослойной хроматографии, масс-спектрометрии, HPLC и/или ЯМР анализа.

(ix) Порошковые рентгеновские дифрактограммы получали (используя аналитический прибор Bruker D4 Analytical Instrument), помещая образец кристаллического материала на пластинчатый держатель Bruker из монокристалла кремния (SSC) и распределяя образец в виде тонкого слоя с помощью предметного стекла. Образец вращали при 30 об/мин (для улучшения статистики подсчета) и облучали рентгеновским излучением, генерируемым медной длинной острофокусной трубкой, эксплуатируемой при 40 кВ и 40 мА и длине волны 1,5418 ангстрема. Коллимированный источник рентгеновского излучения пропускали через автоматическую переменную щель, установленную на V20 и отраженное излучение направляли через 5,89 мм антирассеивающую щель и 9,55 мм щель детектора. Образец экспонировали в течение 0,03 с с приращением в 0,00570° угла 2-θ (режим непрерывного сканирования) в диапазоне от 2 до 40° 2-θ в режиме θ-θ. Время прогона составляло 3 мин и 36 с. Прибор был оборудован детектором, определяющим изменение положения (Lynxeye). Управление и регистрацию данных осуществляли с помощью рабочего блока Dell Optiplex 686 NT 4.0 Workstation, работающего с Diffrac + программным обеспечением.

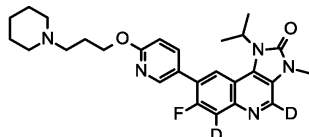
(x) Дифференциальную сканирующую калориметрию проводили на ДСК TA Instruments Q1000. Как правило, менее 5 мг материала, содержащегося в стандартном алюминиевом тигле, оснащенном крышкой, нагревали в диапазоне температур от 25 до 300°C при постоянной скорости нагрева 10°C/мин. Для продувки газом применяли азот с расходом 50 мл/мин.

(xi) Были использованы следующие сокращения: h = час(ы); к.т. = комнатная температура (~18-25°C); конц. = концентрированный; FCC = колоночная флэш-хроматография с использованием диоксида кремния; DCM = дихлорметан; DIPEA = диизопропилэтиламин; DMA = N,N-диметилацетамид; DMF = N,N-диметилформамид; DMSO = диметилсульфоксид; Et₂O = диэтиловый эфир; EtOAc = этилацетат; EtOH = этанол; K₂CO₃ = карбонат калия; MeOH = метанол; MeCN = ацетонитрил; MTBE = метил-трет-бутиловый эфир; MgSO₄ = сульфат магния, безводный; Na₂SO₄ = сульфат натрия, безводный; THF = тетрагидрофуран; насыщ. = насыщенный водный раствор.

(xii) Наименования IUPAC получали, используя либо "Canvas", либо "IBIS"-программы, принадлежащие AstraZeneca. Как указано во введении, соединения данного изобретения основаны на имидазо[4,5-

с]хинолин-2-оне. Однако в некоторых примерах наименование по IUPAC описывает эту основную часть как имидазо[5,4-с]хинолин-2-он. Основы из имидазо[4,5-с]хинолин-2-она и имидазо[5,4-с]хинолин-2-она, тем не менее, являются одинаковыми, а имена согласно конвенции отличаются из-за периферийных групп.

Пример 1. 4,6-Дидейтерио-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он



Смесь родия 5% на угле (210 мг, 0,10 ммоль) и 7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-она (200 мг, 0,42 ммоль) в сухом THF (20 мл) вакуумировали в 3-горлой колбе объемом 250 мл и дважды снова заполняли азотом. Колбу вакуумировали, помещали в атмосферу газообразного дейтерия (2,26E+04 мг, 5610,44 ммоль) и перемешивали при температуре и давлении окружающей среды в течение 4,5 ч, 3 раза заменяли газообразный дейтерий (99,8 ат.% D) в течение данного периода времени. Катализатор удаляли путем фильтрации через целит и промывали с помощью THF. Фильтрат выпаривали при 40°C in vacuo до получения масла, которое отверждалось до грязно-белого твердого вещества (202 мг). Тoluол добавляли (3 мл) и затем удаляли при пониженном давлении. Твердое вещество растирали с ацетонитрилом (3 мл), фильтровали и промывали ацетонитрилом перед высушиванием под вакуумом при 40°C в течение ночи с получением необходимого материала (85 мг, 0,177 ммоль) в виде грязно-белого твердого вещества.

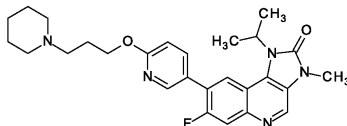
Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 1,33-1,43 (2H, m), 1,49 (4H, p), 1,64 (6H, d), 1,85-1,98 (2H, m), 2,34 (4H, m), 2,39 (2H, t), 3,50 (3H, s), 4,36 (2H, t), 5,28 (1H, p), 6,98 (1H, dd), 8,04 (1H, dt), 8,32 (1H, d), 8,50 (1H, ddd).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 480$.

Отсутствие пиков при значениях примерно δ 7,92 и δ 8,91 характерно для включения дейтерия в 4 и 6 положениях имидазо[4,5-с]хинолинового ядра.

Получение 7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-она описано ниже.

7-Фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он



3-(Пиперидин-1-ил)пропан-1-ол (1,051 г, 7,34 ммоль) в THF (15 мл) медленно добавляли к суспензии гидрида натрия (0,587 г, 14,67 ммоль) в THF (15 мл) и раствор перемешивали при 50°C в течение 40 мин. Добавляли смесь 7-фтор-8-(6-фтор-3-пиридил)-1-изопропил-3-метил-имидазо[4,5-с]хинолин-2-она (2,0 г, 5,64 ммоль) в THF (15 мл) и реакционную смесь перемешивали 6 ч при 50°C, затем давали охладиться до к.т. и гасили водой. При выстаивании наблюдали выпадение в осадок твердого вещества, которое собирали фильтрацией. Этот материал очищали флэш-хроматографией на диоксиде кремния, элюирование с градиентом от 0 до 10% MeOH в DCM, затем - препаративной HPLC (колонка redise gold C18, 80 г), используя смеси с уменьшающейся полярностью, состоящие из воды (содержащей 0,1% NH_3) и MeCN в качестве элюентов, получая требуемый материал. Продукт перекристаллизовали из кипящего EtOH с получением необходимого материала в виде белого твердого вещества (1,512 г, 56,1%).

Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 1,34-1,44 (2H, m), 1,50 (4H, p), 1,65 (6H, d), 1,91 (2H, p), 2,29-2,37 (4H, m), 2,39 (2H, q), 3,51 (3H, s), 4,37 (2H, t), 5,29 (1H, p), 6,99 (1H, dd), 7,92 (1H, d), 8,05 (1H, dt), 8,33 (1H, d), 8,50 (1H, s), 8,91 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 478$.

Требуемый материал можно также выделять в виде соли метансульфоновой кислоты следующим образом. Метансульфоновую кислоту (0,026 г, 0,27 ммоль) в DCM (0,5 мл) добавляли к выделенному свободному основанию (127 мг, 0,27 ммоль) при температуре окружающей среды. Полученный раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 15 мин, затем концентрировали in vacuo и остаток высушивали под вакуумом с получением необходимой соли метансульфоновой кислоты в виде белого твердого вещества (336 мг, 100).

Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 1,78 (6H, d), 1,86-1,99 (4H, m), 2,11-2,25 (2H, m), 2,37-2,48 (2H, m), 2,6-2,74 (2H, m), 2,84 (3H, s), 3,22-3,31 (2H, m), 3,59 (3H, s), 3,69 (2H, d), 4,48-4,56 (2H, m), 5,17-5,27 (1H, m), 6,90 (1H, dd), 7,90 (1H, dt), 7,96 (1H, d), 8,23 (1H, d), 8,39 (1H, d), 8,76 (1H, s), 10,75 (1H, s).

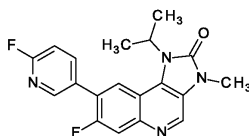
Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 478$.

7-Фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-

он также можно получать непосредственно из 8-бром-7-фтор-1-изопропил-3-метил-имидазо[4,5-с]хинолин-2-она, используя способ, описываемый ниже.

3-(Ди-трет-бутилфосфино)пропан-1-сульфоновую кислоту (0,555 г, 2,07 ммоль) добавляли к ди-натриевой соли тетрахлорида монопалладия(IV) (0,304 г, 1,03 ммоль) в воде (12 мл) в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 10 мин, затем реакцию смесь одной порцией добавляли к 7-фтор-8-(6-фтор-3-пиридил)-1-изопропил-3-метилимидазо[4,5-с]хинолин-2-ону (35,0 г, 103,50 ммоль), 2-[3-(1-пиперидил)пропокс]-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридину (62,2 г, 129,37 ммоль) и карбонату калия (42,9 г, 310,49 ммоль) в диоксане (450 мл) и воде (90 мл) при температуре окружающей среды в инертной атмосфере. Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 16 ч и реакцию смесь упаривали. Неочищенный материал растворяли в DCM (500 мл), промывали солевым раствором (2×100 мл), органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния, градиент элюирования от 0 до 10% (0,1% NH_3 в MeOH) в DCM, с получением необходимого материала в виде коричневого твердого вещества (40,5 г, 82%). Этот материал объединяли с материалом, полученным аналогичным образом (суммарное количество 51,3 г), и суспендировали в MeCN (100 мл). Осадок собирали фильтрацией, промывали, используя MeCN (100 мл), и высушивали под вакуумом, получая требуемый материал в виде белого твердого вещества (32,0 г, 62,4%). Аналитические данные соответствовали данным ранее полученных образцов.

Промежуточное соединение A1. 7-Фтор-8-(6-фтор-3-пиридил)-1-изопропил-3-метил-имидазо[4,5-с]хинолин-2-он



Дихлор-бис-(ди-трет-бутил(3-сульфопропил)фосфонио)палладий(II) (0,05 М раствор в воде, 11,83 мл, 0,59 ммоль) добавляли к дегазированной смеси 8-бром-7-фтор-1-изопропил-3-метил-имидазо[4,5-с]хинолин-2-она (4,0 г, 11,83 ммоль), (6-фторпиридин-3-ил)бороновой кислоты (2,0 г, 14,19 ммоль) и 2 М раствора карбоната калия (17,74 мл, 35,48 ммоль) в 1,4-диоксане (50 мл) и воде (12,5 мл). Смесь продували азотом и нагревали до 80°C в течение 1 ч затем давали охладиться и концентрировали при пониженном давлении для удаления. Оставшийся раствор разбавляли, используя DCM (250 мл), промывали водой (200 мл), органический слой сушили, используя фазоразделительный картридж, и выпаривали, получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния, градиент элюирования от 0 до 10% MeOH в DCM, с получением необходимого материала в виде белого твердого вещества (3,70 г, 88%).

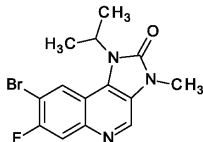
Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 1,77 (6H, dd), 3,58 (3H, d), 5,20 (1H, s), 7,11 (1H, ddd), 7,93 (1H, d), 8,06-8,14 (1H, m), 8,22 (1H, d), 8,46-8,51 (1H, m), 8,72 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 355,3$.

Дихлор-бис-(ди-трет-бутил(3-сульфопропил)фосфоний)палладий(II) (0,05 М раствор в воде) можно приготовить, как описано ниже.

Дегазированную воду (30 мл) добавляли к натриевой соли тетрахлорпалладия(II) (0,410 г, 1,39 ммоль) и 3-(ди-трет-бутилфосфоний)пропан-1-сульфоновой кислоте (0,748 г, 2,79 ммоль) при температуре окружающей среды в инертной атмосфере. Суспензию перемешивали 5 мин, затем твердое вещество удаляли фильтрацией и отбрасывали, оставляя требуемый реагент в виде красно-коричневого раствора.

Промежуточное соединение A2. 8-Бром-7-фтор-1-изопропил-3-метилимидазо[4,5-с]хинолин-2-он

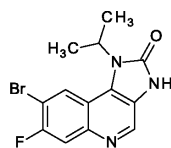


Раствор гидроксида натрия (11,29 г, 282,28 ммоль) в воде (600 мл) добавляли к перемешиваемой смеси 8-бром-7-фтор-1-изопропил-3Н-имидазо[4,5-с]хинолин-2-она (61 г, 188,19 ммоль), бромид тетрабутиламмония (6,07 г, 18,82 ммоль) и метилйодида (23,53 мл, 376,37 ммоль) в DCM (1300 мл) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 17 ч. Тот же процесс повторяли при тех же количествах и реакционные смеси объединяли, концентрировали и разбавляли, используя MeOH (750 мл). Осадок собирали посредством фильтрации, промывали с помощью MeOH (500 мл) и твердое вещество высушивали под вакуумом с получением необходимого материала в виде белого твердого вещества (108 г, 85%).

Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 1,76 (6H, d), 3,57 (3H, s), 5,13 (1H, t), 7,83 (1H, d), 8,41 (1H, d), 8,69 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+ = 380$.

Промежуточное соединение А3. 8-Бром-7-фтор-1-изопропил-3Н-имидазо[4,5-с]хинолин-2-он

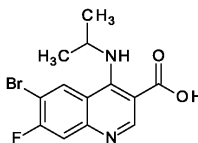


Триэтиламин (164 мл, 1173,78 ммоль) добавляли за одну порцию к 6-бром-7-фтор-4-(изопропиламино)хинолин-3-карбоновой кислоте (128 г, 391,26 ммоль) в DMF (1500 мл) смесь перемешивали при температуре окружающей среды в инертной атмосфере в течение 30 мин. Добавляли дифенилфосфорилазид (101 мл, 469,51 ммоль) и раствор перемешивали в течение дополнительных 30 мин при температуре окружающей среды, затем в течение 3 ч при 60°C. Реакционную смесь выливали в ледяную воду, осадок собирали посредством фильтрации, промывали водой (1 л) и высушивали под вакуумом с получением необходимого материала в виде желтого твердого вещества (122 г, 96%).

Спектр ЯМР: 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ 1,62 (6H, d), 5,12-5,19 (1H, m), 7,92 (1H, d), 8,57 (1H, d), 8,68 (1H, s), 11,58 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+ = 324$.

Промежуточное соединение А4. 6-Бром-7-фтор-4-(изопропиламино)хинолин-3-карбоновая кислота

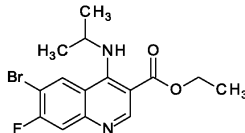


2н. раствор гидроксида натрия (833 мл, 1666,66 ммоль) порциями добавляли к этил-6-бром-7-фтор-4-(изопропиламино)хинолин-3-карбоксилату (148 г, 416,66 ммоль) в THF (1500 мл) при 15°C и полученную смесь перемешивали при 60°C в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали, разбавляли водой (2 л) и смесь подкисляли 2 М соляной кислотой. Осадок собирали фильтрацией, промывали водой (1 л) и высушивали под вакуумом, получая требуемый материал в виде белого твердого вещества (128 г, 94%).

Спектр ЯМР: 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ 1,24-1,36 (6H, m), 4,37 (1H, s), 7,78 (1H, t), 8,55 (1H, s), 8,90 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+ = 327$.

Промежуточное соединение А5. Этил-6-бром-7-фтор-4-(изопропиламино)хинолин-3-карбоксилат

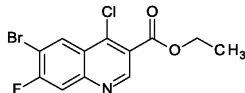


DIPEA (154 мл, 884,07 ммоль) порциями добавляли к пропан-2-амину (39,2 г, 663,05 ммоль) и этил-6-бром-4-хлор-7-фторхинолин-3-карбоксилату (147 г, 442,04 ммоль) в DMA (600 мл) при температуре окружающей среды и полученную смесь перемешивали при 100°C в течение 4 ч. Реакционную смесь выливали в ледяную воду, осадок собирали фильтрацией, промывали водой (1 л) и высушивали под вакуумом с получением необходимого материала в виде светло-коричневого твердого вещества (148 г, 94%).

Спектр ЯМР: 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ 1,26-1,33 (9H, m), 4,17-4,25 (1H, m), 4,32-4,37 (2H, m), 7,28 (1H, d), 8,50 (1H, d), 8,59 (1H, d), 8,86 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+ = 355$.

Промежуточное соединение А6. Этил-6-бром-4-хлор-7-фторхинолин-3-карбоксилат



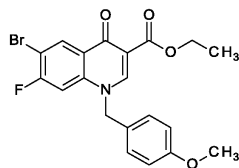
DMF (0,535 мл, 6,91 ммоль) добавляли к этил-6-бром-7-фтор-1-[(4-метоксифенил)метил]-4-оксохинолин-3-карбоксилату (200 г, 460,56 ммоль) в тионилхлориде (600 мл) при 10°C в инертной атмосфере и полученную смесь перемешивали при 70°C в течение 3 ч. Смесь выпаривали досуха и остаток подвергали азеотропной перегонке с толуолом (300 мл), получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали перекристаллизацией из гексана, получая требуемый материал в виде белого твердого вещества (147 г, 96%).

Спектр ЯМР: 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 1,49 (3H, t), 4,51-4,56 (2H, m), 7,91 (1H, d), 8,71 (1H, d), 9,26 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+ = 334$.

Промежуточное соединение А7. Этил-6-бром-7-фтор-1-[(4-метоксифенил)метил]-4-оксохинолин-3-

карбоксилат

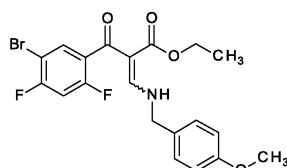


DBU (76 мл, 506,32 ммоль) медленно добавляли к этил-2-(5-бром-2,4-дифторбензоил)-3-[(4-метоксифенил)метиламино]проп-2-еноату (230 г, 506,32 ммоль) в ацетоне (800 мл) при 10°C на протяжении периода продолжительностью 5 мин в инертной атмосфере и полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. Осадок собирали посредством фильтрации, промывали с помощью Et₂O (3×500 мл) и высушивали под вакуумом с получением необходимого материала в виде белого твердого вещества (166 г, 75%).

Спектр ЯМР: ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 1,29 (3H, t), 3,72 (3H, s), 4,22-4,27 (21H, m), 5,57 (2H, s), 6,92-6,95 (2H, m), 7,24 (2H, d), 7,79 (1H, d), 8,40 (1H, d), 8,89 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺ = 434.

Промежуточное соединение A8. Этил-2-(5-бром-2,4-дифторбензоил)-3-[(4-метоксифенил)метиламино]проп-2-еноат

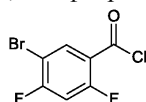


(Е)-Этил-3-(диметиламино)акрилат (80 мл, 555,50 ммоль) по каплям добавляли к смеси DIPEA (132 мл, 757,50 ммоль) и 5-бром-2,4-дифтор-бензоилхлориду (129 г, 505,00 ммоль) в толуоле (600 мл) при температуре окружающей среды в инертной атмосфере. Полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 17ч, а затем давали охладиться. (4-Метоксифенил)метанамин (66,0 мл, 505,29 ммоль) порциями добавляли к смеси и реакцию смесь перемешивали 3 ч при температуре окружающей среды. Реакционную смесь разбавляли, используя DCM (2 л), промывали последовательно водой (4×200 мл), насыщенным соевым раствором (300 мл), органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали, получая требуемый материал в виде твердого вещества светло-коричневого цвета (230 г, 100 %), который использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

Спектр ЯМР: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 1,09 (3H, t), 3,82 (3H, s), 4,00-4,10 (2H, m), 4,55 (2H, t), 6,84-6,96 (3H, m), 7,20-7,29 (2H, m), 7,55 (1H, d), 8,18 (1H, t).

Масс-спектр: масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺ = 454.

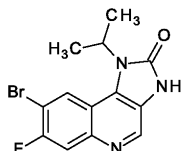
Промежуточное соединение A9. 5-Бром-2,4-дифтор-бензоилхлорид



Тионилхлорид (55,4 мл, 759,50 ммоль) порциями добавляли к смеси DMF (7,84 мл, 101,27 ммоль) и 5-бром-2,4-дифторбензойной кислоте (120 г, 506,33 ммоль) в толуоле (600 мл) при 15°C за период продолжительностью 5 мин, в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали при 70°C в течение 4 ч, затем выпаривали до сухого состояния и остаток подвергали азеотропной перегонке с толуолом с получением необходимого материала в виде коричневого масла (129 г, 100%), которое применяли непосредственно на следующей стадии без очистки.

Спектр ЯМР: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,04-7,09 (1H, m), 8,34-8,42 (1H, m).

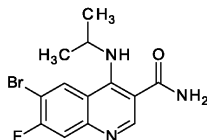
Промежуточное соединение A3, 8-бром-7-фтор-1-изопропил-3Н-имидазо[4,5-с]хинолин-2-он, также можно получать, как описано ниже:



1,3,5-Трихлор-1,3,5-триазиан-2,4,6-трион (5,91 г, 25,45 ммоль) порциями добавляли к перемешиваемой суспензии 6-бром-7-фтор-4-(изопропиламино)хинолин-3-карбоксамида (16,6 г, 50,89 ммоль) и 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундек-7-ена (15,22 мл, 101,79 ммоль) в метаноле (200 мл) при 5°C. Полученную суспензию перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Реакционную смесь отфильтровывали и твердое вещество сушили в вакуумном нагревательном шкафу в течение 2 ч, получая требуемый материал в виде твердого вещества бледно-желтого цвета (14,18 г, 86 %). Дополнительно ма-

териал получали после отстаивания фильтрата в течение 2 дней, а затем фильтрования. Выделенное дополнительное количество твердого материала нагревали в EtOH (50 мл) 30 мин, затем давали охладиться и фильтровали, получая дополнительный требуемый материал в виде белого твердого вещества (2,6 мг). Аналитические данные соответствовали данным, полученным при альтернативных синтезах, описанных выше.

Промежуточное соединение A10. 6-Бром-7-фтор-4-(изопропиламино)хинолин-3-карбоксамид

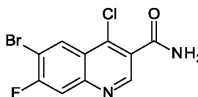


Пропан-2-амин (2,80 мл, 32,62 ммоль) добавляли к суспензии 6-бром-4-хлор-7-фторхинолин-3-карбоксамид (10 г, 29,65 ммоль) и карбоната калия (8,20 г, 59,31 ммоль) в ацетонитриле (250 мл) и смесь перемешивали при 95°C в течение 4 ч. Добавляли дополнительное количество пропан-2-амин (2 мл) и смесь перемешивали при 95°C еще 4 ч а затем при температуре окружающей среды в течение ночи. К смеси добавляли воду и твердое вещество собирали посредством фильтрации и высушивали под вакуумом с получением необходимого материала (8,25 г, 85%).

Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 1,25 (6H, d), 4,17 (1H, d), 7,51 (1H, s), 7,69 (1H, d), 8,11 (2H, s), 8,61 (1H, s), 8,67 (1H, d).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 236$.

Промежуточное соединение A11. 6-Бром-4-хлор-7-фторхинолин-3-карбоксамид

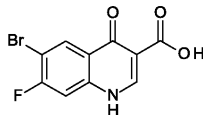


DMF (0,5 мл) добавляли к перемешиваемой суспензии 6-бром-7-фтор-4-оксо-1Н-хинолин-3-карбоновой кислоты (22,5 г, 78,66 ммоль) в тионилхлориде (140 г, 1179,85 ммоль) и смесь нагревали при кипячении с обратным холодильником 2 ч. Реакционной смеси давали охладиться, концентрировали in vacuo и остаток дважды подвергали азеотропной перегонке с толуолом, получая твердое вещество желтого цвета. Данное твердое вещество порциями добавляли к раствору гидроксида аммония (147 мл, 1179,85 ммоль) при 0°C. Белую суспензию перемешивали в течение 15 мин, затем твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали под вакуумом с получением необходимого материала (23,80 г, 100%) в виде белого порошка.

Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 8,92 (1H, s), 8,59 (1H, d), 8,21 (1H, s), 8,09 (1H, d), 7,98 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 304,8$.

Промежуточное соединение A12. 6-Бром-7-фтор-4-оксо-1Н-хинолин-3-карбоновая кислота

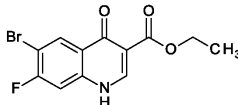


Раствор гидроксида натрия (18,34 г, 458,44 ммоль) в воде (100 мл) добавляли к перемешиваемой суспензии этил-6-бром-7-фтор-4-оксо-1Н-хинолин-3-карбоксилата (28,8 г, 91,69 ммоль) в EtOH (500 мл) при температуре окружающей среды. Затем реакционную смесь перемешивали при 75°C в течение 2 ч. давали охладиться и pH довели до 4, используя 2н. соляную кислоту. Осадок собирали фильтрованием, промывали водой и сушили под вакуумом, получая требуемый материал (23,30 г, 89%) в виде порошка белого цвета.

Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 14,78 (1H, s), 13,45 (1H, s), 8,93 (1H, s), 8,46 (1H, d), 7,70 (1H, d).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 287,8$.

Промежуточное соединение A13. Этил-6-бром-7-фтор-4-оксо-1Н-хинолин-3-карбоксилат



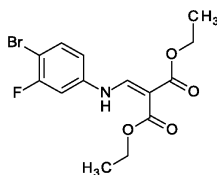
Раствор диэтил-2-[(4-бром-3-фторанилино)метил]пропандиоата (90 г, 249,88 ммоль) в дифениловом эфире (600 мл, 3,79 моль) перемешивали при 240°C в течение 2,5 ч. Обеспечивали охлаждение смеси до 70°C, твердые вещества собирали посредством фильтрации и высушивали в вакуумной печи с получением необходимого материала (50 г, 64%) в виде белого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки.

Спектр ЯМР: ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6 , (100°C)) δ 1,26-1,33 (3H, m), 4,25 (2H, q), 7,52 (1H, d),

8,37 (1H, d), 8,48 (1H, s), 12,05 (1H, s).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+ = 314$.

Промежуточное соединение A14. Диэтил-2-[(4-бром-3-фтор-анилино)метилен]пропандиоат



Раствор 4-бром-3-фторанилина (56,6 г, 297,87 ммоль) и 1,3-диэтил-2-(этоксиметилиден)-пропандиоата (72,45 г, 335,06 ммоль) в EtOH (560 мл) перемешивали при 80°C в течение 4 ч. Обеспечивали охлаждение реакционной смеси, твердые вещества собирали посредством фильтрации и высушивали в печи с получением необходимого материала (90 г, 84%) в виде грязно-белого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки.

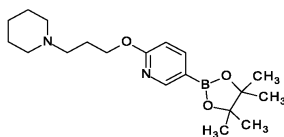
Спектр ЯМР: 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 1,26 (6H, q), 4,14 (2H, q), 4,22 (2H, q), 7,18-7,25 (1H, m), 7,57 (1H, dd), 7,64-7,7 (1H, m), 8,33 (1H, d), 10,62 (1H, d).

Масс-спектр: масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+ = 360$.

8-[6-[3-(Диметиламино)пропокси]-3-пиридил]-7-фтор-1-изопропил-3-метил-имидазо[4,5-с]хинолин-2-он также можно получать непосредственно из 8-бром-7-фтор-1-изопропил-3-метил-имидазо[4,5-с]хинолин-2-она, используя способ, описываемый ниже.

3-(Ди-трет-бутилфосфино)пропан-1-сульфовую кислоту (0,467 мг, 1,77 ммоль) добавляли к динатриевой соли тетрахлорида монопалладия(IV) (0,261 г, 0,89 ммоль) в воде (50 мл) в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды 20 мин, затем реакционную смесь одной порцией добавляли к 8-бром-7-фтор-1-изопропил-3-метил-имидазо[4,5-с]хинолин-2-ону, N,N-диметил-3-[5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридин-2-ил]оксипропан-1-амину (42,4 г, 110,89 ммоль) и карбонату калия (36,8 г, 266,13 ммоль) в диоксане (500 мл) и воде (100 мл) при температуре окружающей среды в инертной атмосфере. Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 2 ч. Реакционный раствор концентрировали под вакуумом и разбавляли, используя DCM. Органическую фазу высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенное вещество очищали с помощью диоксида кремния, градиент элюирования от 0 до 2% MeOH (7 M NH_3 в MeOH) в DCM, с получением твердого вещества, которое растирали с MeCN с получением необходимого материала в виде желтого твердого вещества (25,00 г, 64,4%). Очищенный материал объединяли с дополнительным материалом, полученным аналогичным образом (38,6 г суммарное количество), и нагревали в MeCN (100 мл) в течение 10 мин, затем давали охладиться до 0°C и перемешивали 2 ч. Твердое вещество отфильтровывали под вакуумом и сушили в вакуумном нагревательном шкафу в течение 16 ч получая требуемый материал в виде бледно-желтого кристаллического твердого вещества (35,5 г). Аналитические данные соответствовали данным материала, полученного ранее.

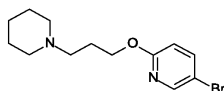
Промежуточное соединение B1. 2-[3-(1-Пиперидил)пропокси]-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридин



n-Бутиллитий (139 мл, 347,59 ммоль) по каплям добавляли к 5-бром-2-[3-(1-пиперидил)пропокси]-пиридину (80 г, 267,37 ммоль) и 2-изопропокси-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолану (64,7 г, 347,59 ммоль) в THF (400 мл), охлажденному до -78°C за период продолжительностью 10 мин, в инертной атмосфере. Полученной смеси давали нагреться до температуры окружающей среды и перемешивали 12 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония (100 мл) и смесь концентрировали при пониженном давлении. Смесь экстрагировали, используя EtOAc (2×500 мл), органический слой промывали насыщенным солевым раствором (2×100 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и выпаривали, получая требуемый материал в виде желтого масла (92 г, 99%). Продукт непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

Спектр ЯМР: 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 1,34 (12H, s), 1,60 (5H, p), 1,93-2,08 (3H, m), 2,39-2,53 (6H, m), 4,34 (2H, dt), 6,67-6,77 (1H, m), 7,92 (1H, dd), 8,50-8,56 (1H, m).

Промежуточное соединение B2. 5-Бром-2-[3-(1-пиперидил)пропокси]пиридин



Гидрид натрия (20,91 г, 522,77 ммоль) порциями добавляли к 3-(пиперидин-1-ил)пропан-1-олу (35,8 г, 250,02 ммоль) в THF (400 мл) при температуре окружающей среды в инертной атмосфере. Полу-

ченную суспензию перемешивали при 50°C в течение 30 мин, затем давали охладиться и добавляли 5-бром-2-фторпиридин (40,0 г, 227,29 ммоль). Раствор перемешивали при 50°C в течение 2 ч, а затем давали охладиться. Реакцию повторяли аналогичным образом, используя гидрид натрия (5,23 г, 130,69 ммоль), 3-(пиперидин-1-ил)пропан-1-ол (8,95 г, 62,50 ммоль), THF (100 мл) и 5-бром-2-фторпиридин (10 г, 56,82 ммоль). Две реакционные смеси объединяли и выливали на лед/воду (1000 мл). Растворитель упаривали при пониженном давлении и смесь экстрагировали, используя DCM (3×150 мл), органический слой промывали насыщенным соевым раствором (3×150 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали, получая требуемый материал в виде коричневого масла (96 г, 113 %). Материал использовали без дополнительной очистки.

Спектр ЯМР: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 1,43-1,49 (2H, m), 1,61 (5H, p), 1,99 (2H, dq), 2,46 (6H, dd), 4,31 (2H, t), 6,65 (1H, d), 7,64 (1H, dd), 8,19 (1H, d).

Масс-спектр: масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺ = 299.

Биологические анализы.

Следующие анализы применяли для измерения эффектов от соединений по настоящему изобретению:

- a) анализ клеточной активности АТМ;
- b) анализ клеточной активности PI3K;
- c) анализ клеточной активности mTOR;
- d) анализ клеточной активности ATR.

При описании анализов в общем:

i) были использованы следующие сокращения: 4NQO = 4-нитрохинолина N-оксид; Ab = антитело; BSA = бычий сывороточный альбумин; CO₂ = диоксид углерода; DMEM = модифицированная по способу Дульбекко среда Игла; DMSO = диметилсульфоксид; EDTA = этилендиаминтетрауксусная кислота; EGTA = этиленгликоль тетрауксусной кислоты; ELISA = твердофазный иммуноферментный анализ; EMEM = минимальная питательная среда Игла; FBS = эмбриональная бычья сыворотка; h = час(ы); HRP = пероксидаза хрена; i.p. = внутривнутрибрюшинно; PBS = забуференный фосфатом физиологический раствор; PBST = забуференный фосфатом физиологический раствор/Tween; TRIS = трис(гидроксиметил)аминометан; реагент MTS: [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий, внутренняя соль, и электрон-связывающий агент (фенозин-метосульфат) PMS; s.c. = подкожно;

ii) значения IC₅₀ рассчитывали, используя интеллектуальную подгоночную модель (smart fitting model) в Genedata. Значение IC₅₀ представляло собой концентрацию исследуемого соединения, которое ингибировало 50% биологической активности.

Анализ а): Клеточная активность АТМ.

Обоснование.

Облучение клеток вызывает двунитевые разрывы ДНК и быстрое межмолекулярное аутофосфорилирование серина 1981, что вызывает диссоциацию димера и инициирует активность клеточной АТМ-киназы. Большинство молекул АТМ в клетке быстро фосфорилируются на этом сайте после такой низкой дозы облучения, как 0,5 Гр, и связывание фосфоспецифического антитела определяют после введения всего лишь нескольких двунитевых разрывов ДНК в клетке.

Анализ рАТМ основан на выявлении ингибиторов АТМ в клетках. Клетки HT29 инкубируют с исследуемыми соединениями в течение 1 ч до рентгеновского облучения. Через 1 ч клетки фиксируют и окрашивают для определения рАТМ (Ser1981). Флуоресценцию считывают, используя платформу обработки изображений аграуscan.

Описание метода.

Клетки HT29 (ECACC #85061109) засевают в 384-луночные аналитические планшеты (Costar #3712) с плотностью 3500 клеток/лунку в 40 мкл среды EMEM, содержащей 1% л-глутамина и 10% FBS, и давали прикрепиться в течение ночи. На следующее утро соединения формулы (I) в 100% DMSO вводили в аналитические планшеты с помощью акустического распределения. После 1 ч инкубирования при 37°C и 5% CO₂ планшеты (вплоть до 6 за один прием) облучали, используя прибор X-RAD 320 (PXi), что эквивалентно ~600 сГр. Планшеты возвращали в инкубатор еще на 1 ч. Затем клетки фиксировали добавлением 20 мкл 3,7% формальдегида в растворе PBS и инкубированием в течение 20 мин при к.т. перед промывкой, используя 50 мкл/лунку PBS, с помощью устройства для мойки планшетов Biotek EL405. Затем добавляли 20 мкл 0,1% Triton X100 в PBS и инкубировали 20 мин при к.т., чтобы сделать клетки проницаемыми. Затем планшеты один раз промывали, используя 50 мкл/лунку PBS, с помощью устройства для мойки планшетов Biotek EL405.

Антитело фосфо-АТМ Ser1981 (Millipore #MAB3806) разбавляли в 10000 раз в PBS, содержащем 0,05% полисорбат/Tween и 3% BSA, и 20 мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение ночи при к.т. На следующее утро планшеты промывали три раза, используя 50 мкл/на лунку PBS, с помощью устройства для мойки планшетов Biotek EL405, а затем добавляли 20 мкл раствора вторичного Ab, содержащего разведенное в 500 раз козье антитело к IgG кролика (Goat anti-rabbit IgG) Alexa Fluor® 488

(Life Technologies, A11001) и 0,002 мг/мл Хехст-красителя (Life technologies #H-3570) в PBS, содержащем 0,05% полисорбат/Tween и 3% BSA. Через 1 ч инкубирования при к.т. планшеты промывали три раза, используя 50 мкл/на лунку PBS, с помощью устройства для мойки планшетов Biotek EL405 и планшеты герметично закрывали и хранили в PBS при 4°C до проведения считывания. Считывание планшетов проводили, используя прибор ArrayScan VTI, применяя фильтр XF53 с объективом 10X. Окрашивание ядер Хехст-красителем и окрашивание вторичного антитела pSer1981 исследовали в режиме с двумя лазерами (при 405 нм и 488 нм, соответственно).

Анализ b): Клеточная активность ATR.

Обоснование.

ATR представляет собой киназу, связанную с PI3-киназой, которая фосфорилирует разнообразные субстраты по остаткам серина или треонина в ответ на повреждение ДНК во время или блокировок репликации. Chk1 - протеинкиназа ATR ниже по каскаду - играет ключевую роль в регулировании контрольных точек повреждения ДНК. При активации Chk1 происходит фосфорилирование Ser317 и Ser345 (последний рассматривается как предпочтительная цель для фосфорилирования/активации посредством ATR). Это был клеточный анализ для измерения ингибирования ATR-киназы путем измерения уменьшения фосфорилирования Chk1 (Ser 345) в клетках HT29 после обработки соединением формулы (I) и УФ-миметиком 4NQO (Sigma #N8141).

Описание способа.

Клетки HT29 (ECACC #85061109) засевали в 384-луночные аналитические планшеты (Costar #3712) с плотностью 6000 клеток/лунку в 40 мкл среды EMEM, содержащей 1% л-глутамина и 10% FBS, и давали прикрепиться в течение ночи. На следующее утро соединение формулы (I) в 100% DMSO вводили в аналитические планшеты с помощью акустического распределения. После 1 ч инкубирования при 37°C и 5% CO₂ в планшеты вводили 40 нл 3 мМ 4NQO в 100% DMSO акустического распределения, при этом исключались лунки для минимального контроля, которые оставляли необработанными 4NQO для создания контрольных образцов с нулевым ответом. Планшеты возвращали в инкубатор еще на 1 ч. Затем клетки фиксировали добавлением 20 мкл 3,7% формальдегида в растворе PBS и инкубированием в течение 20 мин при к.т. Затем добавляли 20 мкл 0,1% Triton X100 в PBS и инкубировали 10 мин при к.т., чтобы сделать клетки проницаемыми. Затем планшеты один раз промывали, используя 50 мкл/лунку PBS, с помощью устройства для мойки планшетов Biotek EL405.

Антитело фосфо-Chk1 Ser 345 (Cell Signalling Technology #2348) разбавляли в 150 раз в PBS, содержащем 0,05% полисорбат/Tween, и 15 мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение ночи при к.т. На следующее утро планшеты промывали три раза, используя 50 мкл/на лунку PBS, с помощью устройства для мойки планшетов Biotek EL405, а затем добавляли 20 мкл раствора вторичного Ab, содержащего разведенное в 500 раз козье антитело к IgG кролика (Goat anti-rabbit IgG) Alexa Fluor 488 (Molecular Probes #A-11008) и 0,002 мг/мл Хехст-красителя (Molecular Probes #H-3570) в PBST. Через 2 ч инкубирования при к.т. планшеты промывали три раза, используя 50 мкл/на лунку PBS, с помощью устройства для мойки планшетов Biotek EL405 и планшеты закрывали герметичными черными планшетными крышками до проведения считывания. Считывание планшетов проводили, используя прибор ArrayScan VTI, применяя фильтр XF53 с объективом 10X. Окрашивание ядер Хехст-красителем и окрашивание вторичного антитела pChk1 исследовали в режиме с двумя лазерами (при 405 и 488 нм соответственно).

Анализ c): Клеточная активность PI3K.

Обоснование.

Этот анализ использовали для измерения ингибирования PI3K-α в клетках. О PDK1 известно, что она является киназой петли активации протеинкиназы B (Akt1) выше по каскаду, что необходимо для активации PKB. Активация липидкиназы - фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) - является ключевым элементом активации PKB посредством PDK1.

После стимулирования лиганда рецептора тирозинкиназ активируется PI3K, которая преобразует PIP2 в PIP3, который связывается PH доменом PDK1, что вызывает рекрутинг PDK1 в плазматическую мембрану, где она фосфорилирует АКТ по Thr308 в петле активации.

Целью этого анализа действия на основе клеток является выявление соединений, ингибирующих активность PDK или рекрутинг PDK1 в мембрану, путем ингибирования активности PI3K. Фосфорилирование фосфо-Akt (T308) в клетках BT474c после обработки соединениями в течение 2 ч является прямым параметром для измерения активности PDK1 и непрямым параметром для измерения активности PI3K.

Описание способа.

Клетки BT474 (карцинома протоков молочной железы человека, ATCC HTB-20) засевали в 384-луночные черные планшеты (Costar #3712) с плотностью 5600 клеток/лунку в среду DMEM, содержащую 10% FBS и 1% л-глутамина, и давали прикрепиться в течение ночи.

На следующее утро соединения в 100% DMSO вводили в аналитические планшеты с помощью акустического распределения. Через 2 ч инкубирования при 37°C и 5% CO₂ среду отсасывали и клетки лизировали буфером, содержащим 25 мМ Tris, 3 мМ EDTA, 3 мМ EGTA, 50 мМ фторида натрия, 2 мМ ор-

тованадата натрия, 0,27 М сахарозы, 10 мМ β -глицерофосфата, 5 мМ пирогосфата натрия, 0,5% Triton X-100 и таблетки из полной смеси ингибиторов протеаз (Roche #04 693 116 001, использовали одну таблетку на 50 мл лизисного буфера).

Через 20 мин лизаты клеток переносили в планшеты для ELISA (Greiner # 781077), на которые предварительно наносили покрытие антитела к общему-AKT в PBS буфере, и неспецифическое связывание блокировали с помощью 1% BSA в PBS, содержащем 0,05% Tween 20. Планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день планшеты промывали PBS буфером, содержащим 0,05% Tween 20, и инкубировали дополнительно с моноклональным мышинным антителом к фосфо-AKT T308 в течение 2 ч. Планшеты снова промывали, как описывается выше, перед добавлением вторичного лошадиного анти-мышинного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена. Через 2 ч инкубирования при к.т. планшеты промывали и в каждую лунку вносили рабочий раствор субстрата QuantaBlu (Thermo Scientific #15169, приготовленный согласно инструкции производителя). Проявленный флуоресцентный продукт фиксировали через 60 мин, вводя в лунки раствор Stop. Данные с планшетов считывали, используя устройство для считывания Tecan Safire с длинами волн возбуждения при 325 нм и испускания при 420 нм, соответственно. Если не указано иное, в этом анализе ELISA использовались реагенты, содержащиеся в сэндвич-наборе ELISA Path Scan Phospho AKT (Thr308), полученном от Cell Signalling (#7144).

Анализ d): Клеточная активность mTOR.

Обоснование.

Этот анализ использовали для измерения ингибирования mTOR в клетках. Целью анализа механизма действия фосфо-AKT на основе клеток с использованием Acumen Explorer является выявление ингибиторов либо PI3K- α , либо mTOR-Rictor (нечувствительный к рапамицину сопутствующий mTOR). Измерение производят по любому снижению фосфорилирования Akt-белка по Ser473 (AKT находится ниже по каскаду от PI3K- α в сигнальном пути трансдукции) в клетках MDA-MB-468 после обработки соединением.

Описание способа.

Клетки MDA-MB-468 (аденокарцинома молочной железы человека #ATCC HTB 132) засевали с плотностью 1500 клеток/лунку в 40 мкл среды DMEM, содержащей 10% FBS и 1% глутамина в 384-луночные с плоским дном черные планшеты Greiner. Клеточные планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C в инкубаторе перед дозированием соединений формулы (I) в 100% DMSO с помощью акустического распределения. Соединения дозировали в 12-точечном интервале концентраций при рандомизированном расположении на планшете. Контрольные лунки создавали либо путем дозирования 100% DMSO (максимальный сигнал), либо путем добавления эталонного соединения (ингибитора PI3K- β), который полностью исключал сигнал pAKT (минимальный контроль). Соединения затем исследовали по одному из двух протоколов А или В анализа.

Протокол А.

Планшеты инкубировали при 37°C в течение 2 ч; клетки затем фиксировали добавлением 10 мкл 3,7% раствора формальдегида. Через 30 мин планшеты промывали, используя PBS, на устройстве для мойки планшетов Tecan PW384. Лунки фиксировали и клетки делали проницаемыми путем добавления 40 мкл PBS, содержащего 0,5% Tween20 и 1% Marvel™ (порошковое сухое молоко) и инкубировали 60 мин при к.т. Планшеты промывали, используя PBS, содержащий 0,5% (об./об.) Tween20, и добавляли по 20 мкл кроличьего антитела к фосфо-AKT Ser473 (Cell Signalling Technologies, #3787) в таком же PBS-Tween + 1% Marvel™ и инкубировали при 4°C в течение ночи.

Планшеты промывали трижды, используя PBS + 0,05% Tween 20, на устройстве Tecan PW384. 20 мкл вторичного антитела Alexa Fluor 488 антикролика (Molecular Probes, #A11008), разведенного в PBS + 0,05% Tween20, содержащем 1% Marvel™, вносили в каждую лунку и инкубировали 1 ч при к.т. Планшеты промывали 3 раза, как и раньше, а затем в каждую лунку вносили по 20 мкл PBS и планшеты закрывали герметичными черными планшетными крышками.

Планшеты немедленно считывали на устройстве Acumen для считывания планшетов, измеряя зеленую флуоресценцию после возбуждения 488 нм лазером. С использованием этой системы получали значения IC₅₀, а качество планшетов определяли по контрольным лункам. Каждый раз использовали эталонные соединения, чтобы следить за параметрами анализа.

Протокол В.

Клеточные планшеты затем инкубировали в течение 2 ч при 37°C перед фиксацией добавлением 20 мкл 3,7% формальдегида в PBS/A (1,2% конечная концентрация) с последующим инкубированием в течение 30 мин при к.т., а затем промывали 2х, используя 150 мкл PBS/A, с помощью устройства для мойки планшетов BioTek ELx406. Клетки делали проницаемыми и фиксировали 20 мкл буфера для анализа (0,1% Triton X-100 в PBS/A + 1% BSA) в течение 1 ч при к.т., а затем промывали 1х, используя 50 мкл PBS/A. Первичное моноклональное кроличье антитело фосфо-AKT (Ser473) D9E XP® (#4060, Cell Signaling Technology) разводили в соотношении 1:200 в буфере для анализа, добавляя 20 мкл в каждую лунку и планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. Клеточные планшеты 3 раза промывали, ис-

пользуя 200 мкл PBS/T, затем в каждую лунку вносили 20 мкл разведенного в соотношении 1:750 буфером для анализа вторичного козьего антитела к IgG кролика Alexa Fluor® 488 (#A11008, Molecular Probes, Life Technologies) с разведенным в соотношении 1:5000 Хехст-красителем 33342. Через 1 ч инкубирования при к.т. планшеты 3 раза промывали, используя 200 мкл PBS/T, и в каждую лунку вносили по 40 мкл PBS без Са, Mg и Na бикарб. (Gibco #14190-094).

Окрашенные клеточные планшеты закрывали герметичными черными крышками и затем считывали, используя платформу обработки изображений Cell Insight (Thermo Scientific), с 10× объективом. Первичный канал (голубая флуоресценция Хехст при 405 нм, BGRFR38623) использовали для аутофокусировки и подсчета числа событий (это давало информацию о цитотоксичности исследуемых соединений). С помощью вторичного канала (зеленый 488 нм, BGRFR_485_20) измеряли окрашивание pAKT. Данные анализировали и рассчитывали IC₅₀, используя программное обеспечение Genedata Screener®.

В табл. 1 сведены результаты исследования примеров, полученные в испытаниях а)-d). Результаты могут представлять собой среднее геометрическое нескольких испытаний.

Таблица 1

Данные об активности для примера 1, полученные в анализах а)-d)

Пример	Значение IC ₅₀ (мкМ) для АТМ в клетках согласно анализу а)	Значение IC ₅₀ (мкМ) для АТР в клетках согласно анализу b)	Значение IC ₅₀ (мкМ) для Р1ЗКа в клетках согласно анализу c)	Значение IC ₅₀ (мкМ) для mTOR в клетках согласно анализу d)
1	0,0025			

В табл. 2 показаны сравнительные данные для некоторых соединений, представленных в CN 102399218 А (параграфы [0249], [0252] и [0102]) и CN 102372711 А (параграфы [0101] и [0268]) в испытаниях а)-d). Результаты могут представлять собой среднее геометрическое нескольких испытаний.

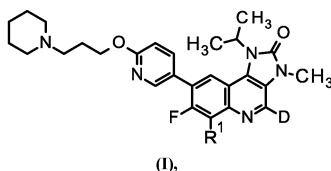
Таблица 2

Данные об активности определенных соединений, представленных
CN 102399218 A и CN 102372711 A в анализах а)-d)

Эталонное соединение	Значение IC ₅₀ (мкМ) для АТМ в клетках согласно анализу а)	Значение IC ₅₀ (мкМ) для АТР в клетках согласно анализу б)	Значение IC ₅₀ (мкМ) для PI3Ka в клетках согласно анализу с)	Значение IC ₅₀ (мкМ) для mTOR в клетках согласно анализу d)
CN102372711A, соединение 1	0,125	0,281	0,188	0,237
CN102372711A, соединение 4	0,0112	0,0686	0,102	0,0729
CN102372711A, соединение 5	0,0265	0,0644	0,153	0,113
CN102399218A, соединение 60	1,76	0,419	4,67	2,31
CN102399218A, соединение 61	3,46	1,48	1,73	0,177
CN102399218A, соединение 62	0,135	0,0553	0,149	0,0155
CN102399218A, соединение 64	0,216	0,162	0,247	0,287
CN102399218A, соединение 94	0,494	0,0129	0,0804	0,0414
CN102399218A, соединение 114	0,0741	0,0686	0,0131	0,0469

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль,
где R¹ представляет собой H или D.

2. Соединение формулы (I) по п.1, где соединение представляет собой 4,6-дидейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Соединение формулы (I) по п.1, где соединение представляет собой 4,6-дидейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он.

4. Соединение формулы (I) по п.1, где соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль 4,6-дидейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]-имидазо[4,5-с]хинолин-2-она.

5. Соединение формулы (I) по п.1, где соединение представляет собой 4-дейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль.

6. Соединение формулы (I) по п.1, где соединение представляет собой 4-дейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-он.

7. Соединение формулы (I) по п.1, где соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль 4-дейтеро-7-фтор-1-изопропил-3-метил-8-[6-[3-(1-пиперидил)пропокси]-3-пиридил]имидазо[4,5-с]хинолин-2-она.

8. Фармацевтическая композиция, которая содержит соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-7 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

9. Применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-7 для лечения рака.

10. Применение по п.9, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль применяются одновременно, отдельно или последовательно с лучевой терапией.

11. Применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-7 для изготовления лекарственного препарата для лечения рака.

