

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038355**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.08.12

(21) Номер заявки

201990023

(22) Дата подачи заявки

2017.06.13

(51) Int. Cl. *C07D 213/73* (2006.01)
C07D 213/74 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) **ЗАМЕЩЕННЫЕ ПИРИДИНЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ DNMT1**

(31) 62/349,227; 62/393,256; 62/412,343

(32) 2016.06.13; 2016.09.12; 2016.10.25

(33) US

(43) 2019.05.31

(86) PCT/IB2017/053511

(87) WO 2017/216727 2017.12.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ГЛЭКСОСМИТКЛАЙН
ИНТЕЛЛЕКТУАЛ ПРОПЕРТИ
ДИВЕЛОПМЕНТ ЛИМИТЕД;
КЭНСЭР РЕСЕРЧ ТЕКНОЛОДЖИ
ЛТД. (GB)**

(72) Изобретатель:

**Адамс Николас Дэвид, Беновиц
Эндрю Б., Руэда Бенедэ Мария**

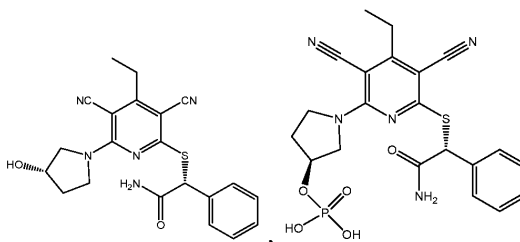
**Лурдес, Эванс Карен Андерсон,
Фосбеннер Дэвид Т., Кинг Брайан
Уэйн, Ли Мей, Луэнго Хуан Игнасио,
Миллер Уилльям Генри, Райф
Александр Джозеф, Ромерил Стюарт
Пол, Шмидт Стэнли Дж. (US),
Батлин Роджер Дж., Голдберг
Кристин М., Джордан Аллан М.,
Кершо Кристофер С., Рауф Али,
Вашкович Богдан (GB)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) KR-A-20110027314

(57) Изобретение относится к замещенным производным пиридина. В частности, изобретение относится к соединениям, соответствующим формулам:



или их фармацевтически приемлемым солям. Соединения по изобретению являются селективными ингибиторами DNMT1 и могут быть использованы при лечении злокачественного новообразования, предраковых состояний, бета-гемоглобинопатий, серповидно-клеточного заболевания, серповидно-клеточной анемии и бета-талассемии и болезней, связанных с ингибированием DNMT1. Изобретение, кроме того, относится к фармацевтическим композициям/комбинациям, содержащим соединение по изобретению в качестве активного ингредиента. Изобретение далее относится к способам ингибирования активности DNMT1.

B1**038355****038355****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к замещенным производным пиридина, которые являются селективными ингибиторами активности ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1). Настоящее изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащим такие соединения, и способам применения таких соединений при лечении злокачественного новообразования, предраковых симптомов, бета-гемоглобинопатий, серповидно-клеточного заболевания, серповидно-клеточной анемии и бета-талассемии, и других заболеваний, связанных с ингибированием DNMT1.

Предпосылки изобретения

Эпигенетика - это способ включения и выключения генов независимо от последовательности ДНК, на которой они расположены. Метилирование ДНК, происходящее в промоторах генов, представляет собой пример репрессивной эпигенетической метки, приводящей к уплотнению хроматина и сайленсингу генов. Метилирование ДНК опосредуется семейством белков ДНК метилтрансферазы (DNMT), которое состоит из четырех членов семейства. Три члена семейства, DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, содержат активность ДНК-метилтрансферазы. Эти три члена ответственны за установление схемы метилирования ДНК de novo, тогда как DNMT1 в первую очередь отвечает за поддержание схемы метилирования в дочерних цепях после репликации ДНК.

При злокачественном новообразовании схема метилирования ДНК становится aberrантной, что приводит к глобальному гипометилированию и локальному гиперметилированию в зонах промотора. Это может привести к уменьшению сайленсинга генов-супрессоров опухолей (Ting et al., Genes Dev. 2006; 20:3215-3231). Кроме того, сайленсинг DNMT1 приводит к деметилированию ДНК и реэкспрессии генов-супрессоров опухолей, что приводит к ингибированию роста опухоли (Zhou et al., Oncol. Lett. 2014; 5:2130-2134).

Ингибиторы метилирования ДНК (называемые ДНК гипометилирующими агентами) являются клинически подтвержденными противораковыми лекарственными средствами, используемыми для лечения MDS, AML и CMML. Несмотря на то что эти агенты являются доступными, по-прежнему существует значительная возможность для улучшения в отношении токсичности, полезности при солидных опухолях и пероральной биодоступности. Следовательно, новый ингибитор DNMT будет представлять интерес для лечения злокачественного новообразования и/или какого-либо заболевания или состояния, опосредуемого ДНК-метилированием. Особый интерес для данного изобретения представляет непосредственное ориентирование на DNMT1, чтобы предотвратить распространение аномальных схем метилирования (таких как те, которые происходят при злокачественном новообразовании) до дочерних нитей в процессе репликации.

В документах US 2008/0132525 и WO 2006/078752 описаны ингибиторы ДНК-метилтрансферазы. В документе CA 2030875 описаны способы и зонды для обнаружения нуклеозидного транспортера и способ получения зондов.

Гемоглобинопатии.

Гемоглобиновые нарушения, такие как серповидно-клеточная анемия и бета-талассемия, представляют собой наиболее распространенные наследственные заболевания крови в мире. Сердечная анемия и бета-талассемия характеризуются нарушениями гемоглобина, который является несущим кислород белковым комплексом в эритроцитах. Структурно гемоглобин обычно состоит из двух пар белков плюс четыре молекулы тема. Взрослые и дети старше четырех месяцев экспрессируют форму гемоглобина, называемую гемоглобином у взрослого, который преимущественно состоит из двух альфа-глобиновых белков в паре с двумя белками бета-глобина и четырьмя молекулами тема. Тем не менее плоды в утробе и младенцы обычно экспрессируют главным образом эмбриональный гемоглобин, который состоит из двух альфа-глобиновых белков в паре с двумя гамма-глобиновыми белками плюс четыре молекулы тема. Отмечается, что существуют две формы гамма-глобина, называемые G-гамма и A-гамма, которые кодируются двумя разными генами (HBB1 и HBB2), но являются функционально эквивалентными в значительной степени; фетальный гемоглобин относится к комбинации пары G-гамма и/или A-гамма плюс пара альфа-глобиновых белков плюс четыре молекулы тема.

При серповидно-клеточной анемии ген, кодирующий бета-глобин, содержит мутацию, которая приводит к аномальной структуре гемоглобина и заставляет эритроциты принимать характерную серповидную форму при определенных условиях. Эта серповидная форма приводит к снижению пластичности эритроцитов, увеличению времени капиллярного транзита и частым вазоокклюзионным процессам, которые могут повредить ткани и привести к заболеваемости пациентов. Напротив, бета-талассемия характеризуется неадекватно продукцией бета-глобина в сочетании с нормально продуцируемым альфа-глобином. В результате накопление альфа-глобина токсично для предшественников эритроцитов и приводит к неэффективному эритропоэзу и обширному гемолизу эритроцитов.

В настоящее время нет одобренного фармакологического лечения для лечения серповидно-клеточной анемии или бета-талассемии. Однако было доказано, что увеличение количества эритроцитов, которые продуцируют фетальный гемоглобин, в сочетании с общим увеличением уровня фетального гемоглобина на эритроцит, дает клинический эффект на пациентах с серповидно-клеточной анемией и больных с серповидно-клеточным заболеванием, уменьшая частоту острых вазоокклюзивных кризисов.

Как правило, хотя клинически не доказано, биология заболевания бета-талассемии предполагает, что увеличение продукции фетального гемоглобина до высоких уровней также может являться жизнеспособной стратегией для терапии этого заболевания.

Объект этого терапевтического подхода, дерепрессия молчащих генов HBG1 и HBG2, может быть направлен на вмешательство в эпигенетический процесс при эритропоэзе. Изменения в ДНК-метилировании являются ключевыми определяющими событиями в ходе гемопоэза, отмечая этапы дифференциации, которые приводят к коммитированиям различных клеточных линий. В процессе эритропоэза быстрое снижение глобального ДНК-метилирования демаркирует коммитированную точку ν для экспрессии эритроидных специфических регуляторов GATA1 и KLF1 и подавления регуляторов гематопоэтических предшественников GATA2 и PU.1 (1, 2). Для клеток эритроидного предшественника во взрослом костном мозге ДНК в промоторной области гена бета-глобина HBB становится неадаптированной, что соответствует экспрессии белка бета-глобина высокого уровня. Напротив, промоторы локусов HBG1 и HBG2 являются метилированными, что приводит к значительному уменьшению экспрессии гамма-глобиновых белков (3). Хотя ДНК метилтрансферазы DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, каждая, экспрессируют в эритроидных предшественниках, относительно повышенная экспрессия DNMT1, особенно на заключительных этапах эритроидной дифференцировки, свидетельствует о том, что она играет доминирующую роль в регуляции гена глобина (2). 5-Азацитидин и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин) являются ингибиторами рап-DNMT, которые представляют собой известные индукторы фетального гемоглобина в клетках эритроидного предшественника. В культуре эритроидных клеток и на *in vivo* модели индукции фетального гемоглобина (4,5) этими агентами лечение приводит к уменьшению метилирования участков CpG в промоторах HBG с соответствующим увеличением экспрессии белка гамма-глобина. Более того, в ограниченном наборе клинических исследований оба агента вызывали увеличение фетального гемоглобина у пациентов с серповидно-клеточной анемией, серповидно-клеточным заболеванием и бета-талассемией (6-9). Являющиеся эффективными при индуцировании фетального гемоглобина, эти агенты не были широко использованы для лечения серповидно-клеточной анемии, серповидно-клеточного заболевания или бета-талассемии из-за опасений касательно долгосрочной безопасности, дозолимитирующей токсичности и неподходящего пути дозирования.

Ссылки:

(1) Pop R, Shearstone JR, Shen Q, Liu Y, Hallstrom K, Koulonis M, et al. A key commitment step in erythropoiesis is synchronized with the cell cycle clock through mutual inhibition between PU.1 and S-phase progression. 2010;8.

(2) Shearstone JR, Pop R, Bock C, Boyle P, Meissner A, Socolovsky M. Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. 2011;334:799-802.

(3) Mabaera R, Richardson CA, Johnson K, Hsu M, Fiering S, Lowrey CH. Developmental- and differentiation-specific patterns of human +|- and +|-globin promoter DNA methylation. 2007;110:1343-52.

(4) Chin J, Singh M, Banzon V, Vaitkus K, Ibanez V, Kouznetsova T, et al. Transcriptional activation of the +|-globin gene in baboons treated with decitabine and in cultured erythroid progenitor cells involves different mechanisms. 2009;37:1131-42.

(5) Akpan I, Banzon V, Ibanez V, Vaitkus K, DeSimone J, Lavelle D. Decitabine повышает фетальный гемоглобин in *Papio anubis* by increasing +|-globin gene transcription. 2010;38:989-93.

(6) Dover GJ, Charache SH, Boyer SH, Talbot J, Smith KD. 5-Azacytidine повышает фетальный гемоглобин production in a patient with sickle cell disease. 1983;134:475-88.

(7) Sauntharajah Y, Hillery CA, Lavelle D, Molokie R, Dorn L, Bressler L, et al. Effects of 5-aza-2GC|-deoxycytidine on фетальный гемоглобин levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. 2003;102:3865-70.

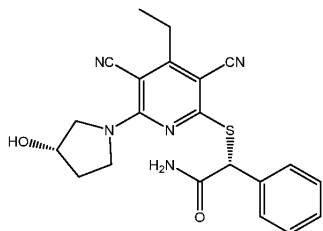
(8) Ley TJ, DeSimone J, Noguchi CT, Turner PH, Schechter AN, Heller P, et al. 5-Azacytidine повышает +|-globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. 1983;62:370-80.

(9) Lowrey CH, Nienhuis AW. Brief report: Treatment with azacitidine of patients with end-stage +|- thalassemia. 1993;329:845-8.

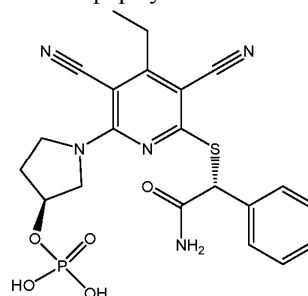
Объектом настоящего изобретения является получение новых соединений, которые являются селективными ингибиторами DNMT1.

Объектом настоящего изобретения является также получение соединений, которые повышают продукцию гамма-глобина, и таким образом также повышают продукцию фетального гемоглобина в эритроидных клетках человека. Соединения по этому изобретению, таким образом, могут быть использованы при лечении серповидно-клеточной анемии и серповидно-клеточного заболевания. Бета-талассемия также может быть ослаблена лечением с помощью этих соединений.

Объектом настоящего изобретения является также получение фармацевтической композиции, которая содержит фармацевтическое вспомогательное вещество и соединения формулы:



ИЛИ



Кроме того, объектом настоящего изобретения является разработка способа лечения злокачественного новообразования, предраковых симптомов, бета-гемоглобинопатий, таких как серповидно-клеточное заболевание, серповидно-клеточная анемия и бета-талассемия, который включает введение новых селективных ингибиторов активности DNMT1.

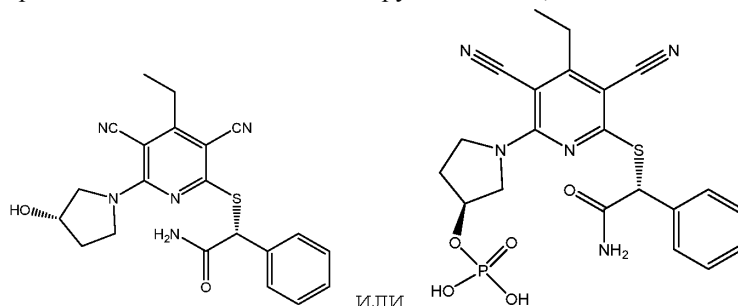
Сущность изобретения

Изобретение относится к замещенным производным пиридина. В частности, изобретение относится к соединениям, соответствующим формулам:



ИЛИ

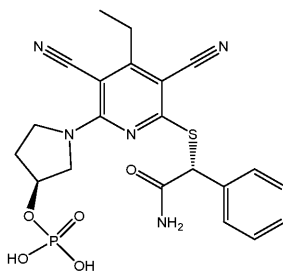
Настоящее изобретение относится также к обнаружению того, что соединения



ИЛИ

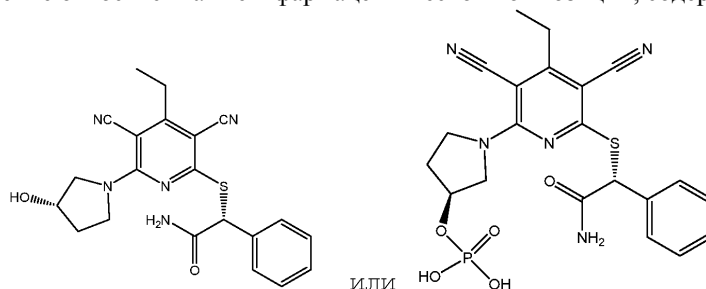
являются активными в качестве ингибиторов DNMT1 и селективными в отношении DNMT3A и DNMT3B.

В предпочтительном варианте изобретение относится к соединению, представленному следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли.

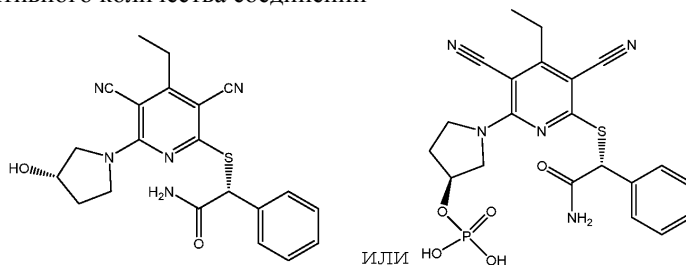
Данное изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей соединения



ИЛИ

или их фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Данное изобретение относится также к способу лечения заболевания, выбранного из злокачественного новообразования, предраковых состояний, бета-гемоглобинопатий, серповидно-клеточного заболевания, у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединений



ИЛИ

или их фармацевтически приемлемой соли.

В предпочтительном варианте данное изобретение относится к способу лечения серповидно-

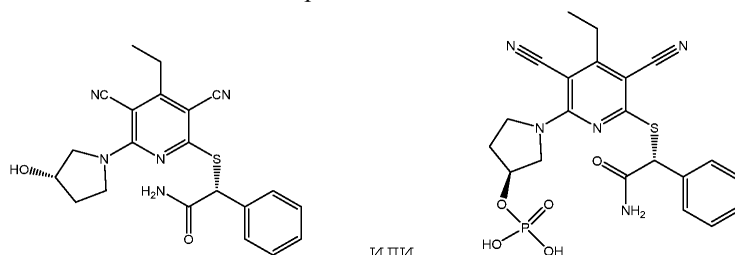
клеточной анемии.

В более предпочтительном варианте данное изобретение относится к способу лечения бета-талассемии.

В еще более предпочтительном варианте данное изобретение относится к способу лечения, в котором млекопитающим является человек.

В наиболее предпочтительном варианте данное изобретение относится к способу, в котором указанное злокачественное новообразование выбрано из следующих: опухоль мозга (глиома), глиобластома, астроцитомы, мультиформная глиобластома, синдром Баньяна-Зонана, болезнь Коудена, болезнь Лермитта-Дюкло, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак почек, рак легких, рак печени, меланома, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарцинома, протоковая аденокарцинома, аденосквамозная карцинома, ацинарно-клеточный рак, глюкагонома, инсулинома, рак предстательной железы, саркома и рак щитовидной железы.

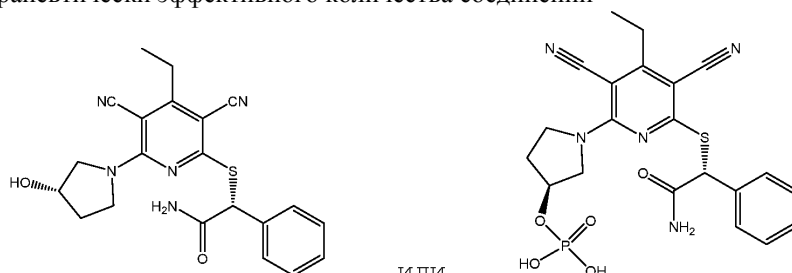
Данное изобретение относится также к применению соединений



ИЛИ

или их фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного средства для лечения или уменьшения тяжести злокачественного новообразования.

Данное изобретение относится также к способу ингибирования активности DNMT1 (ДНК-метилтрансферазы) у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединений



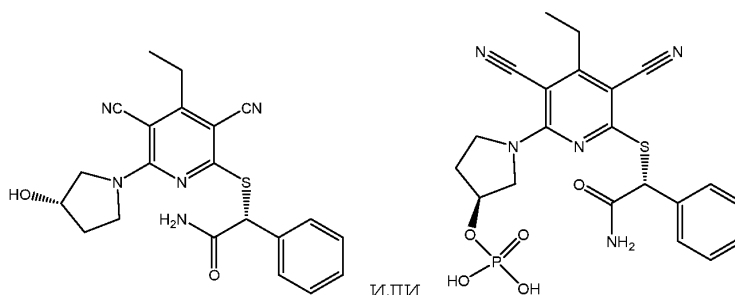
ИЛИ

или их фармацевтически приемлемой соли.

В более предпочтительном варианте данное изобретение относится к способу ингибирования, в котором млекопитающим является человек.

Данное изобретение относится также к способу лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества:

а) соединений



ИЛИ

или их фармацевтически приемлемой соли; и

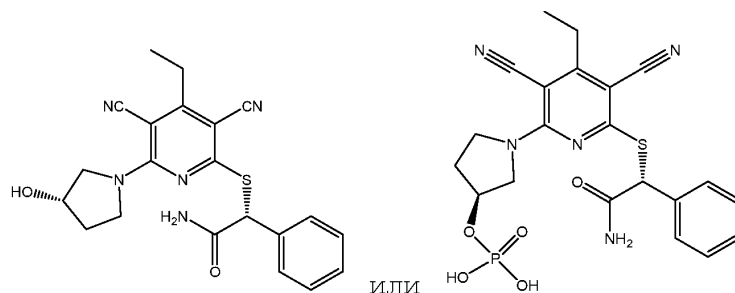
б) по меньшей мере одного противоопухолевого агента.

В предпочтительном варианте данное изобретение относится также к способу лечения, в котором по меньшей мере один противоопухолевый агент выбран из группы, включающей антимицротрубочковые агенты, платиновые координационные комплексы, алкилирующие агенты, антибиотики, ингибиторы топоизомеразы II, антимаболиты, ингибиторы топоизомеразы I, гормоны и аналоги гормонов, ингибиторы пути передачи сигналов, ингибиторы ангиогенеза нерецепторной тирозинкиназы, иммунотерапевтические агенты, проапоптотические агенты, ингибиторы сигнализации клеточного цикла, ингибиторы протеасом, ингибиторы ракового метаболизма, анти-PD-L1 агенты, антагонист PD-1, иммуномодулято-

ры, соединения, модулирующие STING, ингибиторы CD39, антагонисты аденозина A2a и A2a, антагонисты TLR4, антитела к ICOS и антитела к OX40.

Данное изобретение относится также к фармацевтической комбинации, содержащая:

а) соединения



или их фармацевтически приемлемую соль; и

б) по меньшей мере один противоопухолевой агент.

В предпочтительном варианте изобретение относится к фармацевтической комбинации для лечения злокачественного новообразования.

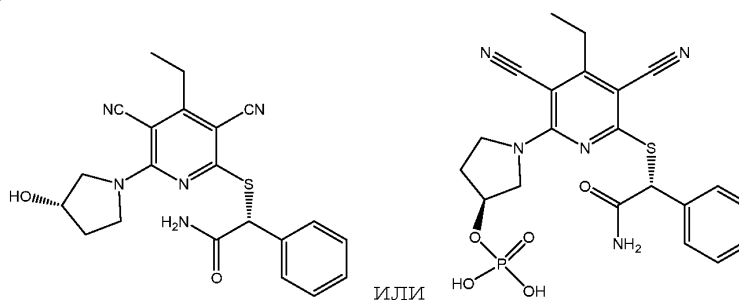
В более предпочтительном варианте изобретение относится к способу злокачественного новообразования у нуждающегося в этом млекопитающего, в котором указанное злокачественное новообразование выбрано из следующих: рак груди, воспалительный рак груди, дуктальная карцинома, лобулярная карцинома, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, инсулинома, аденокарцинома, протоковая аденокарцинома, аденосквамозная карцинома, ацинарно-клеточный рак, глюкоганома, рак кожи, меланома, метастатическая меланома, рак легких, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточная карцинома, крупноклеточная карцинома, опухоль мозга (глиома), глиобластома, астроцитомы, мультиформная глиобластома, синдром Баньяна-Зонана, болезнь Коудена, болезнь Лермитта-Дюкло, опухоль Вильмса, саркома Юинга, рабдомиосаркома, эпендимома, медуллобластома, рак головы и шеи, рак почек, рак печени, меланома, рак яичников, рак предстательной железы, саркома, остеосаркома, гигантоклеточная опухоль кости, рак щитовидной железы, лимфобластный Т-клеточный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический нейтрофильный лейкоз, острый лимфобластный Т-клеточный лейкоз, плазмацитома, иммунобластный крупноклеточный лейкоз, лейкоз мантийных клеток, множественная миелома, мегакариоблокальный лейкоз, острый мегакариоцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, эритролейкоз, злокачественная лимфома, лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы, Т-клеточная лимфобластная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, нейробластома, рак мочевого пузыря, рак вульвы, рак шейки матки, рак эндометрия, мезотелиома, рак пищевода, рак слюнных желез, печеночноклеточный рак, рак желудка, рак носоглотки, рак щеки, рак полости рта, GIST (гастроинтестинальная стромальная опухоль), нейроэндокринные раковые образования и рак яичка.

В предпочтительном варианте изобретение относится к способу злокачественного новообразования у нуждающегося в этом млекопитающего, в котором млекопитающим является человек.

В более предпочтительном варианте изобретение относится к способу злокачественного новообразования у нуждающегося в этом млекопитающего, в котором указанное предраковое состояние выбрано из: интраэпителиальной цервикальной неоплазии, моноклональной гаммапатии неустановленной этиологии (MGUS), миелодиспластического синдрома, апластической анемии, болезни шейки матки, неусовкой кожи (предмеланома), простатической интраэпителиальной (интрадуктальной) неоплазии (PIN), дуктальной карциномы in situ (DCIS), полипов толстой кишки и тяжелой формы гепатита или цирроза.

Данное изобретение относится также к фармацевтической комбинации, содержащей:

а) соединения



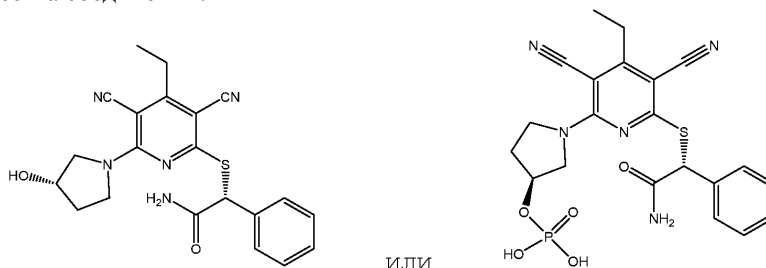
или их фармацевтически приемлемую соль; и

б) по меньшей мере один агент, используемый для лечения бета-гемоглобинопатий.

В предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации для лечения серповидно-клеточного заболевания.

В более предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации для лечения бета-талассемии.

Данное изобретение относится также к способу лечения заболевания, выбранного из диабетической нефропатии, диабета, повреждения подоцитов, атеросклероза, псориаза, идиопатического легочного фиброза, склеродермии, цирроза печени, ревматоидного артрита и болезни Альцгеймера, у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединений:

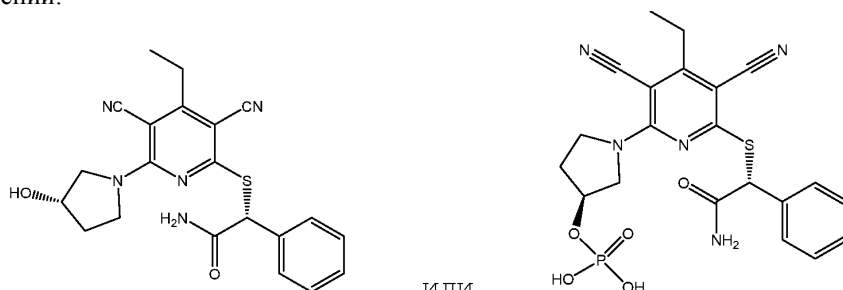


ИЛИ

или их фармацевтически приемлемой соли.

В предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, в котором млекопитающим является человек.

Данное изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей от 0,5 до 1000 мг соединений:



ИЛИ

или их фармацевтически приемлемой соли, и от 0,5 до 1000 мг фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А показано действие соединения А на эритроидные клетки-предшественники (ЕРС). Показательные результаты (n=3 исследования для каждого) 5-дневной обработки соединением А на фетальном гемоглобине (HbF) ELISA (открытые кружки) и в анализе роста клеток (закрытые кружки).

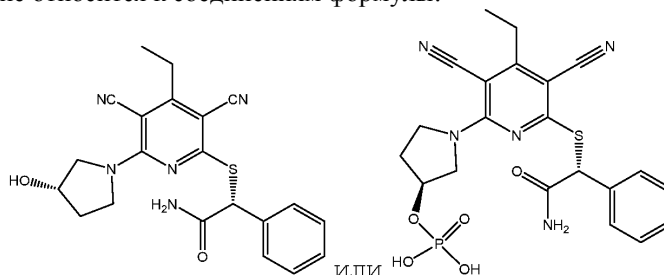
На фиг. 1В показано действие соединения А на HBG1 и HBG2 ДНК-метилирование. Эритроидные клетки-предшественники (ЕРС) обрабатывали в течение 3 дней несущей средой (серые столбики) или 5 мкМ соединения А (черные столбики), геномную ДНК экстрагировали и секвенировали бисульфитом для девяти локусов в промоторных областях HBG1 и HBG2, которые ранее были описаны как сайты DNMT1 цитозин метилирования. Участки метилирования отмечены как положения относительно соответствующих стартовых участков.

На фиг. 2А показано действие соединения А на фетальный гемоглобин на модели трансгенных мышей. Соединение А, вводимое перорально трансгенным мышам модели серповидно-клеточного заболевания (SCD) по 10 или 50 мг/кг, два раза в день, ежедневно вызывало дозозависимое увеличение % белка HbF, определяемое с помощью ЖХВД.

На фиг. 2В показано действие соединения А на фетальный гемоглобин на модели трансгенных мышей. Соединение А, вводимое перорально SCD трансгенным мышам по 10 или 50 мг/кг, два раза в день, ежедневно вызывало дозозависимое увеличение % F-ретикулоцитов и % F-эритроцитов, определяемое с помощью проточной цитометрии.

Подробное описание изобретения

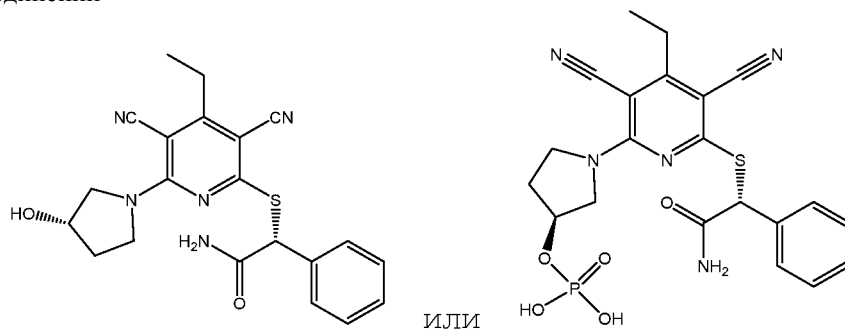
Данное изобретение относится к соединениям формулы:



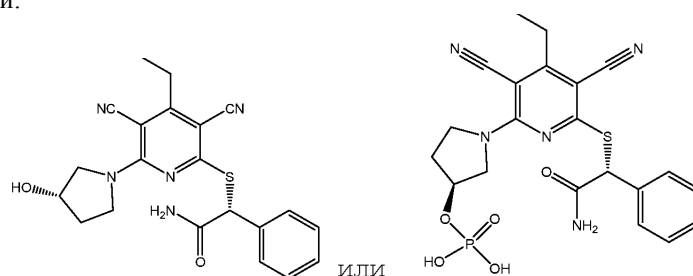
ИЛИ

и их фармацевтически приемлемым солям и к их применению в способах по изобретению.

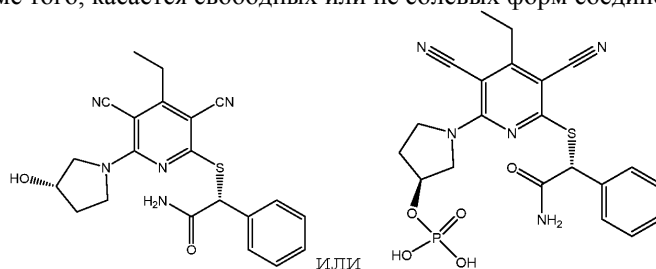
Специалисту в данной области будет понятно, что могут быть получены фармацевтически приемлемые соли соединений



Действительно, в некоторых вариантах изобретения фармацевтически приемлемые соли упомянутых выше соединений могут быть предпочтительными относительно соответствующего свободного или несолевого соединения. Соответственно, изобретение, кроме того, касается фармацевтически приемлемых солей соединений:



Изобретение, кроме того, касается свободных или не солевых форм соединений:



Фармацевтически приемлемые соли соединений по изобретению легко могут быть получены специалистами в данной области.

Характерные фармацевтически приемлемые добавки кислот включают, но этим не ограничиваются, 4-ацетамидобензоат, ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат (безилат), бензоат, бисульфат, битартрат, бутират, эдетат кальция, камфорат, камфорсульфонат (камзилат), каприат (деcanoат), капроат (гексаноат), каприлат (октаноат), циннамат, цитрат, цикламат, диглюконат, 2,5-дигидроксibenзоат, дисукцинат, додецилсульфат (эстолат), эдетат (этилендиаминтетраацетат), эстолат (лаурилсульфат), этан-1,2-дисульфат (эдизилат), этансульфонат (эзилат), формиат, фумарат, галактарат (мукат), гентизат (2,5-дигидроксибензоат), глюкогептонат (глюцептат), глюконат, глюкуронат, глутамат, глутарат, глицерофосфат, гликолят, гексилрезорцинат, гиппурат, гидрабамин (N,N'-ди(дегидроабиетил)этилендиамин), гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, гидроксинафтоат, изобутират, лактат, лактобионат, лаурат, малат, малеат, малонат, метансульфонат (мезилат), метилсульфат, мукат, нафталин-1,5-дисульфат (нападисилат), нафталин-2-сульфонат (напсилат), никотинат, нитрат, олеат, пальмитат, п-аминобензолсульфонат, п-аминосалицилат, памоат (эмбонат) пантотенат, пектинат, персульфат, фенилацетат, фенилэтилбарбитурат, фосфат, полигалактуронат, пропионат, п-толуолсульфонат (тозилат), пироглутамат, пируват, салицилат, себацит, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфамат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат (8-хлортеофиллинат), тиоцианат, триэтиодид, ундеканат, ундециленат и валерат.

Характерные фармацевтически приемлемые соли добавления оснований включают, но этим не ограничиваются, соли алюминия, 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиола (TRIS, трометамин), аргинина, бенетамина (N-бензилфенетиламина), бензатина (N,N'-дibenзилэтилендиамин), бис-(2-гидроксиэтил)амин, висмута, кальция, хлорпрокаина, холина, клемизола (1-п-хлорбензил-2-пирроллидин-1'-илметилбензимидазола), циклогексиламина, дибензилэтилендиамин, диэтиламина, диэтилтриамина, диметиламина, диметилэтанолamina, допамина, этаноламина, этилендиамин, L-гистидина, железа, изохинолина, лепидина, лития, лизина, магния, меглумина (N-метилглуamina), пи-

перазина, пиперидина, калия, прокаина, хинина, хинолина, натрия, стронция, трет-бутиламина и цинка.

Соединения по изобретению могут существовать в виде твердого вещества. В виде твердого вещества соединение по изобретению может существовать в диапазоне состояний твердого вещества, варьируемого от полностью аморфного до полного кристаллического. Термин "аморфный" относится к состоянию, при котором у вещества отсутствует дальний порядок на молекулярном уровне и, в зависимости от температуры, могут проявляться физические свойства твердого вещества или жидкости. Обычно такие материалы не дают отличительных рентгеновских дифракционных параметров и, проявляя свойства химического вещества, более формально описываются как жидкость. При нагревании происходит переход от свойств твердого вещества к свойствам жидкого вещества, что характеризуется изменением состояния, как правило, с большим порядком ("сдвиг стекла"). Термин "кристаллический" относится к фазе твердого вещества, в которой вещество имеет регулярную упорядоченную внутреннюю структуру на молекулярном уровне и дает отличительную рентгенограмму с определенными пиками. Такие вещества, достаточно нагретые, также будут демонстрировать свойства жидкости, но переход от твердого вещества к жидкости характеризуется изменением фазы обычно первого порядка (точка плавления).

Соединения по изобретению могут обладать способностью кристаллизоваться более чем в одном виде, характеристика, которая известна как полиморфизм ("полиморфы"). Полиморфизм обычно может возникать как реакция на изменение температуры или давления или их обоих, он может также быть результатом изменений процесса кристаллизации. Полиморфы можно отличать по различным физическим характеристикам, известным в данной области, такими как рентгенограммы, растворимость и температура плавления.

Определения

Как используется в настоящем документе, символы и условные обозначения, используемые в этих процессах, схемах и примерах, соответствуют тем, которые используются в современной научной литературе, например, в Journal of the American Chemical Society или Journal of Biological Chemistry. Стандартные однобуквенные или трехбуквенные сокращения обычно используются для обозначения аминокислотных остатков, которые, как предполагается, находятся в L-конфигурации, если не указано иное. Если не указано иное, все исходные материалы были получены от коммерческих поставщиков и использованы без дальнейшей очистки. В частности, в примерах и во всем описании могут использоваться следующие сокращения:

Ac - ацетил;
 As₂O - уксусный ангидрид;
 A-CN - ацетонитрил;
 AIBN - азо-бис-изобутиронитрил;
 BINAP - 2,2'-бис-(дифенилфосфино-1,1'-бинафтил);
 BMS - комплекс боран-диметилсульфид;
 Bn - бензил;
 Boc - трет-бутоксикарбонил;
 Boc₂O - ди-трет-бутил дикарбонат;
 BOP - гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окси-трис-(диметиламино)фосфония;
 CAN - церий аммоний нитрат;
 Cbz - бензилоксикарбонил;
 CSI - хлорсульфонил изоцианат;
 CSF - фторид цезия;
 DABCO - 1,4-диазабцикло[2,2,2]октан;
 DAST - трифторид диэтиламиносеры;
 DBU - 1,8-диазабцикло[5,4,0]ундец-7-ен;
 DCC - дициклогексил карбодиимид;
 DCE - 1,2-дихлорэтан;
 DCM - дихлорметан;
 DDQ - 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон;
 ATP - аденозин трифосфат;
 бис-пинаколатодиборон - 4,4,4',5,5,5'-октаметил-2,2'-би-1,3,2-диоксаборолан;
 BSA - альбумин бычьей сыворотки;
 C18 - относится к 18-углеродной алкильной группе на кремнезем в неподвижной фазе ЖХВД;
 CH₃-CN - ацетонитрил;
 Cy - циклогексил;
 DCM - дихлорметан;
 DIEA - диизопропилэтиламин;
 DIPEA - основание Хунига, N-этил-N-(1-метилэтил)-2-пропанамин;
 диоксан - 1,4-диоксан;
 DMAP - 4-диметиламинопиридин;
 DME - 1,2-диметоксиэтан;

DMEDA - N,N'-диметилэтилендиамин;
 ДМФ - N,N-диметилформамид;
 ДМСО - диметилсульфоксид;
 DPPA - дифенилфосфорилазид;
 EDC - гидрохлоридная соль N-(3-диметиламинопропил)-N'этилкарбодимид
 EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота;
 EtOAc - этилацетат;
 EtOH - этанол;
 Et₂O - диэтиловый эфир;
 HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил-этансульфоновая кислота;
 HATU - гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуория;
 HOAt - 1-гидрокси-7-азабензотриазол;
 HOBt - 1-гидроксибензотриазол;
 HOAc - уксусная кислота;
 ЖХВД - жидкостная хроматография высокого давления;
 HMDS - гексаметилдисилазид;
 основание Хунига - N,N-диизопропилэтиламин;
 IPA - изопропиловый спирт;
 индолин - 2,3-дигидро-1H-индол;
 KHMDS - калия гексаметилдисилазид;
 LAlH - литийалюминийгидрид;
 LDA - диизопропиламид лития;
 LHMDS - гексаметилдисилазид лития;
 MeOH - метанол;
 MTBE - метил-трет-бутиловый эфир;
 мкМ - микромолярный;
 mCPBA - м-хлорпербензойная кислота;
 NaHMDS - натрия гексаметилдисилазид;
 NCS - N-хлорсукцинимид;
 NBS - N-бромсукцинимид;
 PE - петролейный эфир;
 Pd₂(dba)₃ - трис-(добензилиденацетон)дипалладий(0);
 комплекс Pd(dppf)Cl₂·DCM - комплекс [1,1'-бис-(дифенилфосфино)ферроцен]дихлор-
 палладий(II)-дихлорметан;
 PyBOP - гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония;
 PyBOP - гексафторфосфат бромтрипирролидинофосфония;
 ОФЖХВД - обращенно-фазовая жидкостная хроматография высокого давления;
 RT - комнатная температура;
 насыщ. - насыщенный;
 SFC - сверхкритическая флюидная хроматография;
 SGC - хроматография на силикагеле;
 SM - исходное вещество;
 TLC - тонкослойная хроматография;
 TEA - триэтиламин;
 TEMPO - 2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксил, свободный радикал;
 ТФУ - трифторуксусная кислота;
 ТГФ - тетрагидрофуран;
 Ts-Cl - п-толуолсульфонилхлорид).

Все ссылки на эфир относятся к диэтиловому эфиру и на насыщенный солевой раствор относятся к насыщенному водному раствору NaCl.

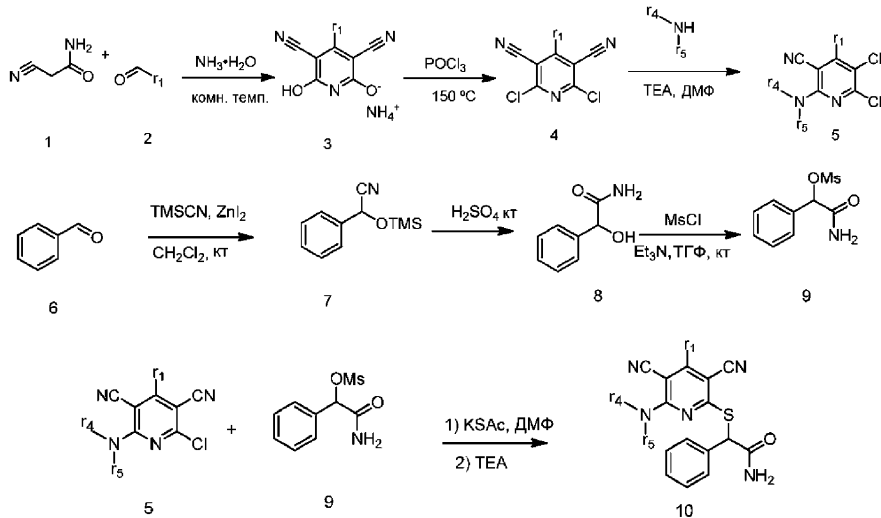
Получение соединений.

Соединения по настоящему изобретению получают с использованием обычных методов органического синтеза. Подходящие пути синтеза проиллюстрированы далее следующими общими схемами реакций. Все исходные материалы являются коммерчески доступными или могут быть легко получены специалистами в данной области техники из коммерчески доступных исходных материалов.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что, если заместитель, описанный в настоящем документе, не совместим с описанными в настоящем документе синтетическими способами, заместитель может быть защищен подходящей защитной группой, которая устойчива к условиям реакции. Защитную группу можно удалить в подходящей точке реакционной последовательности для получения желаемого промежуточного или целевого соединения. Специалистам в данной области хорошо известны подходящие защитные группы и способы введения защиты и удаления защиты различных заместителей с

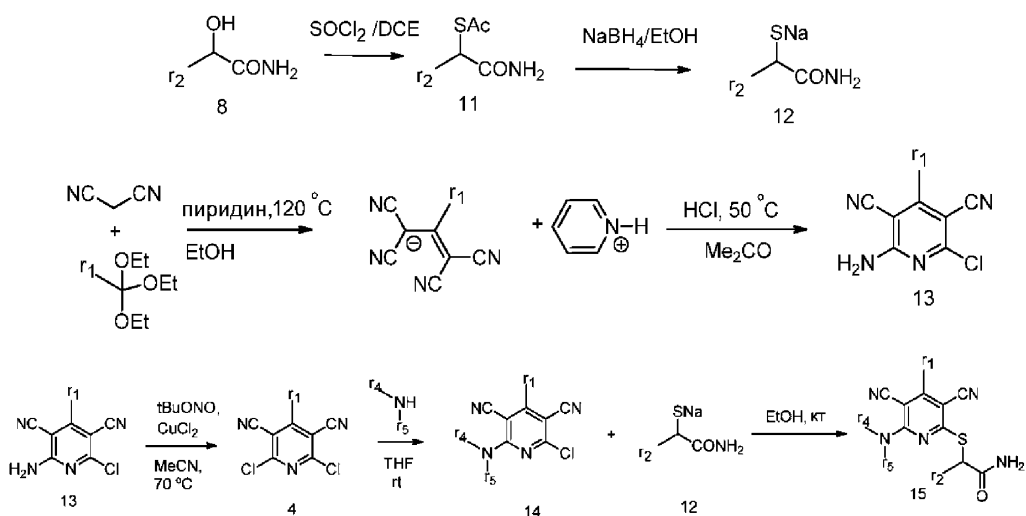
использованием таких подходящих защитных групп; примеры которых можно найти в обзоре T. Greene and P. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis* (4th ed.), John Wiley & Sons, NY (2006). В некоторых случаях заместитель может быть выбран в качестве реакционноспособного в условиях реакции. В этих условиях реакции выбранный заместитель преобразуют в другой заместитель, который либо может быть использован в качестве промежуточного соединения, либо является желательным заместителем в целевом соединении.

Схема 1



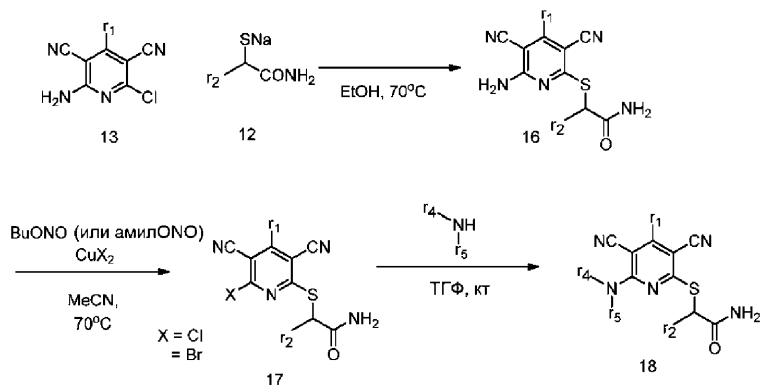
В некоторых случаях промежуточное соединение формулы 13 было использовано с получением промежуточного соединения формулы 4, как показано на схеме 2, и использовано на последующих стадиях, как показано на схемах 1 и 2.

Схема 2



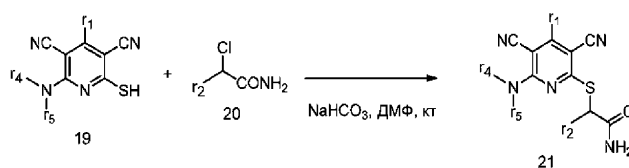
В других случаях промежуточное соединение формулы 13 использовалось с получением соединения формулы 16, которое было использовано на последующих стадиях с получением соединения формулы 1, 8, как описано на схеме 3.

Схема 3



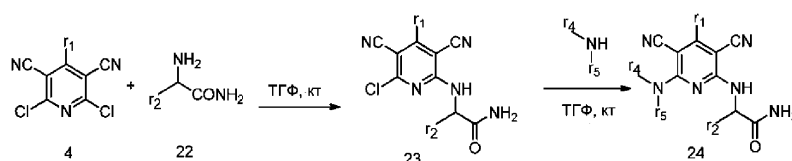
В некоторых случаях соединения формулы 19 и 20 были использованы для получения соединения формулы 21, как описано на схеме 4.

Схема 4



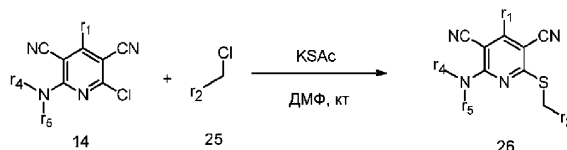
Соединения формулы 24 были получены синтетическим путем, показанным на схеме 5. Промежуточные соединения формулы 22 являются коммерчески доступными соединениями, которые могут являться или не являться отдельными энантиомерами. Когда соединения формулы 22 представляют собой отдельные энантиомеры, тогда такими являются и соответствующие соединения формулы 23 и формулы 24.

Схема 5



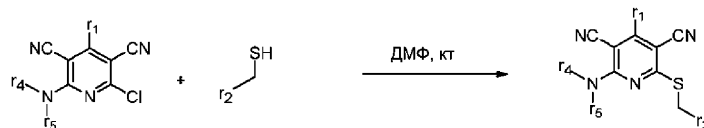
Для получения соединений формулы 26 были использованы промежуточное соединение формулы 14 и промежуточное соединение формулы 25, как показано на схеме 6. Промежуточные соединения формулы 25 являются коммерчески доступными или было синтезировано с использованием обычных способов органического синтеза, которые могут быть воспроизведены любым квалифицированным специалистом.

Схема 6



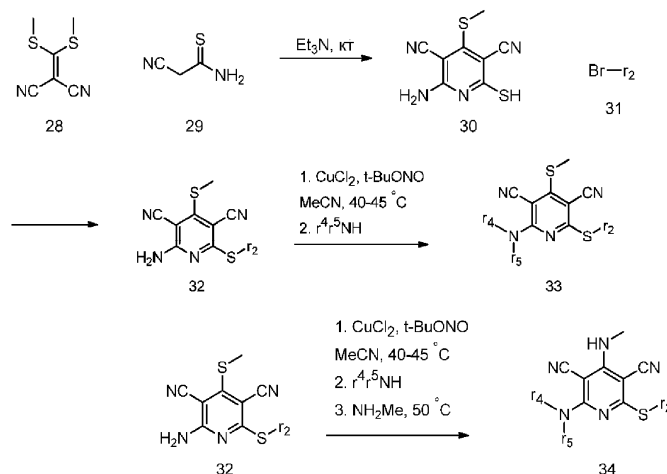
Альтернативно, для получения соединения формулы 26, были использованы промежуточное соединение формулы 14 и промежуточное соединение формулы 27, как показано на схеме 7. Промежуточное соединение формулы 27 является коммерчески доступным или было синтезировано с использованием обычных способов органического синтеза, которые могут быть воспроизведены любым квалифицированным специалистом.

Схема 7



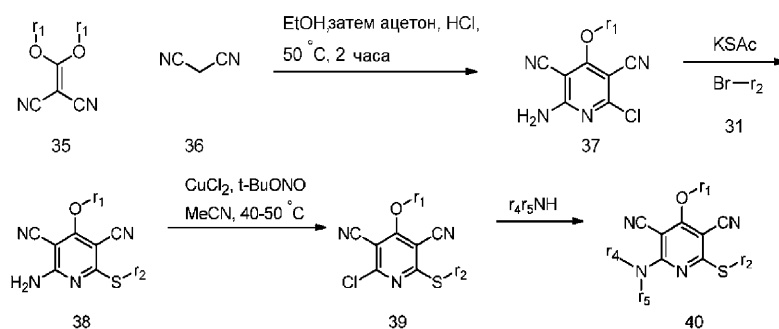
Соединения формул 33 и 34 были получены путями синтеза, показанными на схеме 8. Промежуточные соединения 28 и 29 являются коммерчески доступными соединениями. Промежуточное соединение формулы 31 является коммерческим или было синтезировано с использованием обычных способов органического синтеза, которые могут быть воспроизведены любым квалифицированным специалистом.

Схема 8



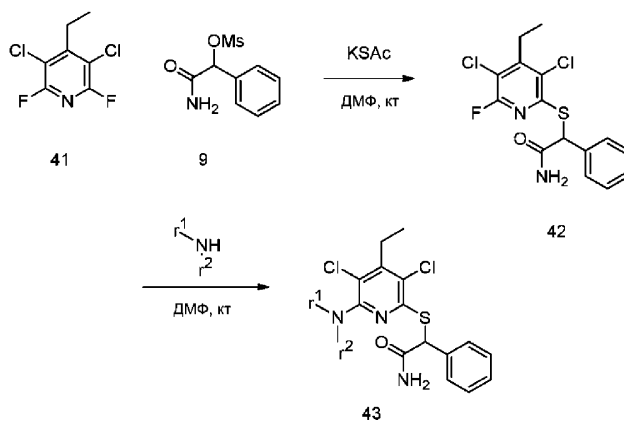
Соединения формулы 40 были получены путями синтеза, показанными на схеме 9. Промежуточные соединения 35 и 36 являются коммерчески доступными соединениями. Промежуточное соединение формулы 31 является коммерчески доступным или было синтезировано с использованием обычных способов органического синтеза, которые могут быть воспроизведены любым квалифицированным специалистом.

Схема 9



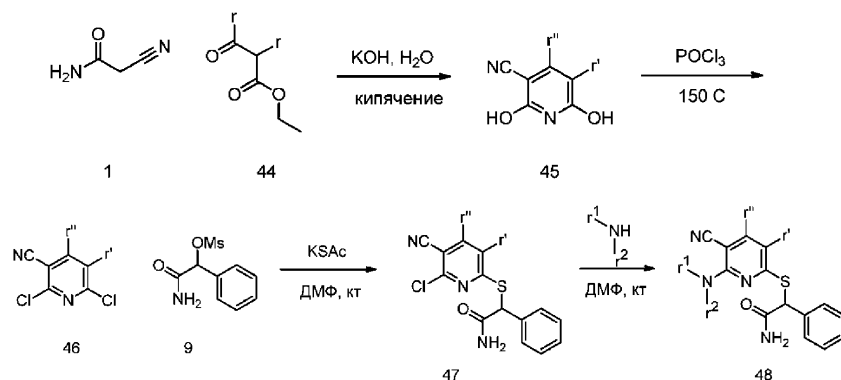
Соединение формулы 43 было получено путями синтеза, показанными на схеме 10. Промежуточное соединение 41 является коммерчески доступным.

Схема 10



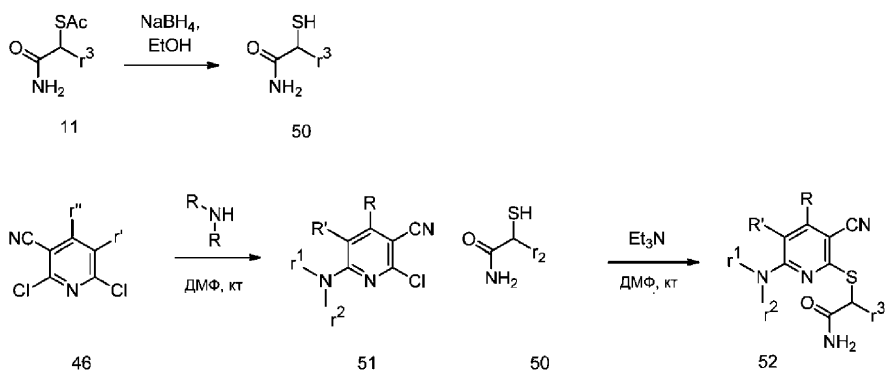
Соединение формулы 48 было получено путями синтеза, показанными на схеме 11. Промежуточные соединения 1 и 44 являются коммерчески доступными.

Схема 11



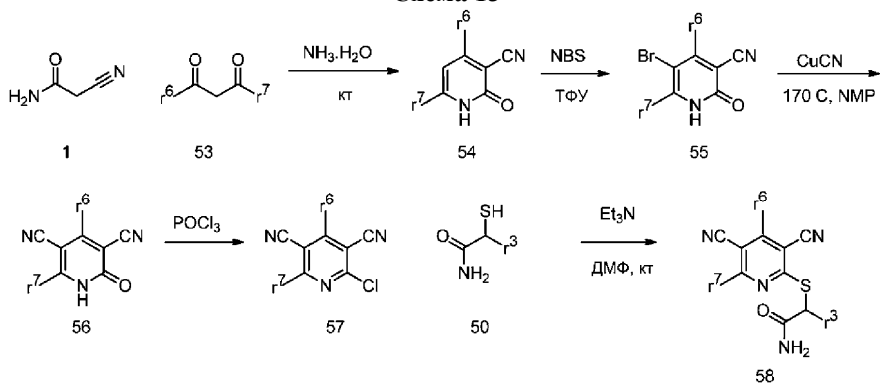
Соединение формулы 52 было получено путями синтеза, показанными на схеме 12. Промежуточное соединение 49 является коммерчески доступным, и получение промежуточного соединения 46 показано выше на схеме 11.

Схема 12



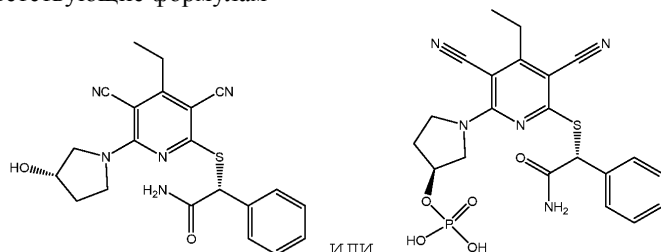
Соединения формулы 58 были получены путями синтеза, показанными на схеме 13. Промежуточные соединения 1 и 53 являются коммерчески доступными.

Схема 13



Способы применения.

Соединения, соответствующие формулам



и их фармацевтически приемлемые соли являются селективными ингибиторами DNMT1. Эти соединения являются потенциально полезными при лечении состояний, которые реагируют на селективное ингибирование DNMT1.

Термин "лечение" и его производные, как используется в настоящем документе, применительно к состоянию означают (1) улучшение состояния или одного или нескольких биологических проявлений состояния; (2) препятствование (а) одной или более точек в биологическом каскаде, которые приводят к состоянию или несут ответственность за состояние; или (b) одно или несколько биологических проявлений этого состояния; (3) облегчение одного или нескольких симптомов или эффектов, связанных с состоянием; или (4) замедление прогрессирования состояния или одного или нескольких биологических проявлений состояния.

Термин "лечение" и его производные относится к лечебной терапии. Лечебная терапия подходит для облегчения симптомов или для лечения при ранних признаках заболевания или при его прогрессировании.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что "предупреждение" не является абсолютным термином. В медицине "предупреждение" понимается как относящееся к профилактическому введению лекарственного средства для существенного уменьшения вероятности или тяжести состояния или его биологического проявления или для задержки наступления такого состояния или его биологического проявления.

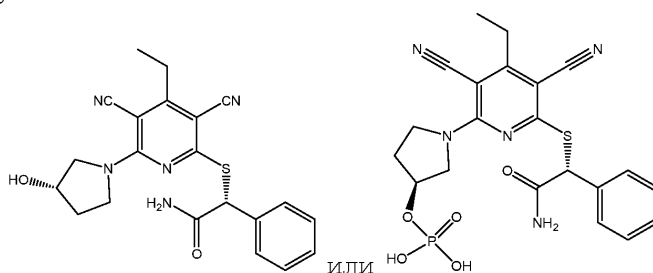
Профилактическая терапия является подходящей, когда субъект имеет, например, вполне определенный семейный анамнез злокачественного новообразования или, с другой стороны, у него предполагается высокий риск развития злокачественного новообразования, или когда субъект подвергается воздействию канцерогена, или когда субъект имеет вполне определенный семейный анамнез бета-

гемоглинопатии, такой как серповидно-клеточное заболевание, серповидно-клеточная анемия, или бета-талассемии.

Как используется в настоящем документе, термин "эффективное количество" и его производное означает, что количество лекарственного или фармацевтического агента, которое будет вызывать такой биологический или медицинский ответ ткани, системы, животного или человека, которого добывается, например, исследователь или врач. Кроме того, термин "терапевтически эффективное количество" и его производное означает любое количество, которое по сравнению с соответствующим субъектом, не получившим такого количества, приводит к улучшению лечения, заживлению, профилактике или ослаблению заболевания или побочного эффекта, или уменьшению скорости прогрессирования заболевания или расстройств. Термин охватывает также количество, эффективное для усиления нормальной физиологической функции.

Как используется в настоящем документе, термин "пациент" или "субъект" относится к человеку или иному млекопитающему. Подходящим пациентом или субъектом является человек.

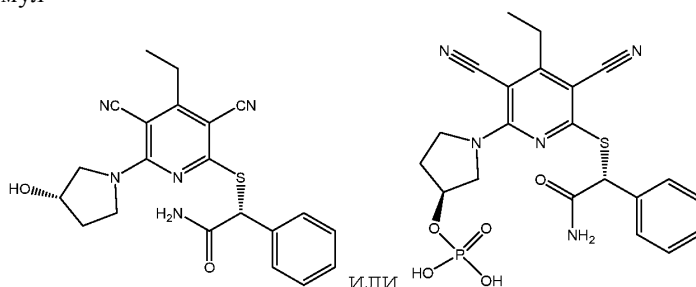
Соединения формул



или их фармацевтически приемлемые соли могут быть введены любым подходящим путем введения, включая системное введение.

Системное введение включает пероральное введение и парентеральное введение. Парентеральное введение относится к путям введения, отличным от энтерального, трансдермального или путем ингаляции, и обычно осуществляется путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает внутривенную, внутримышечную и подкожную инъекцию или инфузию.

Соединения формул

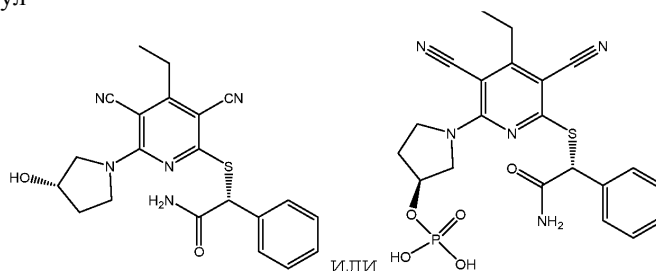


или их фармацевтически приемлемые соли могут быть введены один раз или в соответствии с режимом дозирования, при котором количество доз вводят с различными интервалами времени в течение определенного периода времени.

Например, дозы можно вводить один, два, три или четыре раза в день. Дозы могут быть введены до тех пор, пока не будет достигнут желаемый терапевтический эффект или в течение неопределенного срока для поддержания желаемого терапевтического эффекта. Подходящие схемы дозирования для соединения по изобретению зависят от фармакокинетических свойств этого соединения, таких как абсорбция, распределение и период полувыведения, которые могут быть определены специалистом в данной области. Кроме того, назначаются подходящие режимы дозирования, включая продолжительность таких режимов для соединения по изобретению, в зависимости от состояния, подлежащего лечению, от тяжести состояния, подлежащего лечению, от возраста и физического состояния пациента, проходящего лечение, истории болезни пациента, проходящего лечение, характера одновременной терапии, желаемого терапевтического эффекта и подобных факторов в объеме знаний и опыта квалифицированного специалиста. Специалистам в данной области техники будет понятно, что подходящие режимы дозирования могут потребовать корректировки с учетом реакции отдельного пациента на режим дозирования или с течением времени, если для отдельного пациента необходима корректировка.

Типичные суточные дозы могут варьироваться в зависимости от конкретного выбранного пути введения. Типичные дозы для перорального введения варьируются от 1 до 1000 мг на человека на дозу. Предпочтительные дозы составляют 1-500 мг один раз в день или BID на человека.

Соединения формул



и их фармацевтически приемлемые соли могут быть совместно введены вместе по меньшей мере с одним другим активным агентом, используемым ранее при лечении злокачественного новообразования или предраковых симптомов.

Под термином "совместное введение", используемым в настоящем документе, подразумевается либо одновременное введение, либо любой способ раздельного последовательного введения ингибитора активности DMNT1, описанного в настоящем документе, и еще одного активного агента или агентов, которые, как известно, могут быть использованы в лечении рака, включая химиотерапию и лучевую терапию.

Термин "дополнительный активный агент или агенты", как используется в настоящем документе, включает любое соединение или терапевтический агент, известные или которые демонстрируют благоприятные свойства при введении пациенту, нуждающемуся в лечении злокачественного новообразования. Предпочтительно, когда введение не является одновременным, соединения вводят в близком по времени интервале относительно друг друга. Кроме того, не имеет значения, вводят ли соединения в одной и той же лекарственной форме, например одно соединение может вводиться инъекцией, а другое соединение может вводиться перорально.

Примеры дополнительного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевого агента) для использования в комбинации или совместного введения с предложенными в настоящем изобретении комбинациями указаны ниже. Этот список не является ограничивающим. Дополнительные противоопухолевые средства предназначены для использования с предложенными в настоящем изобретении соединениями.

Как правило, по настоящему изобретению для лечения злокачественного новообразования совместно может быть введен любой противоопухолевый агент, который обладает активностью в отношении восприимчивой опухоли, подлежащей лечению. Примеры таких агентов можно найти в обзоре Cancer Principles and Practice of Oncology by V.T. Devita and S. Hellman (editors), 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Типичные противоопухолевые средства, используемые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, антимицротрубочковые агенты, такие как дитерпеноидные алкалоиды и алкалоиды барвинка; координационные комплексы платины; алкилирующие агенты, такие как азотный иприт, оксазафосфорины, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены; антибиотические агенты, такие как антрациклины, актиномицины и блеомицины; ингибиторы топоизомеразы II, такие как эпиподофиллотоксины; антиметаболиты, такие как пуриновые и пиримидиновые аналоги и антифолаты; ингибиторы топоизомеразы I, такие как камптотецины; гормоны и аналоги гормонов; ингибиторы пути передачи сигнала; ингибиторы ангиогенеза нерцепторной тирозинкиназы; иммунотерапевтические средства; проапоптотические агенты; ингибиторы сигнализации клеточного цикла; ингибиторы протеасомы; и ингибиторы ракового метаболизма.

Примерами дополнительного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевого агента) для использования в комбинации или при совместном введении с предложенными в настоящем изобретении комбинациями являются химиотерапевтические агенты.

Антимицротрубочковые или антимитотические агенты представляют собой фазоспецифичные агенты, активные против микротрубочек опухолевых клеток во время M-фазы или фазы митоза клеточного цикла. Примеры антимицротрубочковых агентов включают, но не ограничиваются ими, дитерпеноиды и алкалоиды барвинка. Дитерпеноиды, которые получают из природных источников, являются фазоспецифичными противораковыми агентами, которые действуют во время фаз G2/M клеточного цикла. Считается, что дитерпеноиды стабилизируют субъединицу β -тубулина микротрубочек путем связывания с этим белком. По-видимому, затем разборка белка ингибируется с остановкой митоза и последующей гибелью клеток. Примеры дитерпеноидов включают, но не ограничиваются ими, паклитаксел и его аналог доцетаксел.

Паклитаксел, 5 β ,20-эпокси-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -гекса-гидрокситакс-11-ен-9-он-4,10-диацетат-2-бензоат 13-эфир с (2R,3S)-N-бензоил-3-фенилизосерином, представляет собой природный дитерпеновый продукт, выделенный из Тихоокеанского тисового дерева *Taxus brevifolia* и является коммерчески доступным в виде инъекционного раствора TAXOL®. Он является представителем таксанового семейства терпенов. Паклитаксел был одобрен в Соединенных Штатах для клинического применения при лечении рефрактерного рака яичников и рака груди.

Доцетаксел, (2R,3S)-N-карбокси-3-фенилизосерин, N-трет-бутиловый сложный эфир, 13-эфир с 5β-20-эпокси-1,2α,4,7β,10β,13α-гексагидрокситакс-11-ен-9-он-4-ацетат-2-бензоатом, тригидратом, является коммерчески доступным в виде инъекционного раствора как TAXOTERE®. Доцетаксел показан для лечения рака груди. Доцетаксел является полусинтетическим производным паклитаксела q.v., полученным с использованием природного предшественника, 10-деацетил-баккатина III, экстрагированного из игл Европейского тиса. Дозоограничивающей токсичностью доцетаксела является нейтропения.

Алкалоиды барвинка являются фазовыми противоопухолевыми агентами, полученными из растения барвинка. Алкалоиды барвинка действуют на M-фазу (митоз) клеточного цикла путем специфического связывания с тубулином. Следовательно, связанная молекула тубулина не может полимеризоваться в микротрубочки. Считается, что митоз останавливается на стадии метафазы с последующей гибелью клеток. Примеры алкалоидов барвинка включают, но этим не ограничиваются, винбластин, винкрестин и винорелбин.

Винбластин, винкалейкобластин сульфат, является коммерчески доступным как VELBAN® в виде инъекционного раствора. Хотя он, возможно, показан во второй линии терапии различных солидных опухолей, в первую очередь он показан при лечении рака яичек и различных лимфом, включая болезнь Ходжкина и лимфоцитарные и гистиоцитарные лимфомы. Побочным эффектом, ограничивающим дозу винбластина, является миелосупрессия.

Винкрестин, винкалейкобластин, 22-оксо-, сульфат, является коммерчески доступным как ONCOVIN® в виде инъекционного раствора. Винкрестин показан для лечения острого лейкоза, а также нашел применение при лечении злокачественных лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы. Алопеция и неврологические эффекты являются наиболее распространенными побочными действиями винкрестина и в меньшей степени возникают эффекты миелосупрессии и желудочно-кишечного мукозита.

Винорелбин, 3',4'-дидегидро-4'-дезоксид-8'-норвинкалейкобластин [R-(R*,R*)-2,3-дигидрокси-бутандиол (1:2) (соль)], коммерчески доступный в виде инъекционного раствора винорелбин тартрата (NAVELBINE®), представляет собой полусинтетический алкалоид барвинка. Винорелбин показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами, такими как цисплатин, при лечении различных солидных опухолей, в частности, немелкоклеточного рака легких, распространенного рака молочной железы и гормонально-рефрактерного рака предстательной железы. Миелосупрессия является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом винорелбина.

Координационные комплексы платины представляют собой нефазоспецифичные противоопухолевые агенты, которые взаимодействуют с ДНК. Комплексы платины проникают в опухолевые клетки, гидратируют и образуют внутри- и межцепочечные сшивки с ДНК, вызывая неблагоприятные биологические воздействия на опухоль. Примеры координационных комплексов платины включают, но ими не ограничиваются, цисплатин и карбоплатин.

Цисплатин, цис-диамминдихлороплатина, является коммерчески доступным как PLATINOL® в виде инъекционного раствора. Цисплатин в первую очередь показан при лечении метастатического рака яичек и яичников и прогрессирующего рака мочевого пузыря. Основными дозоограничивающими побочными эффектами являются нефротоксичность, которая может контролироваться гидратацией и диурезом, а также ототоксичность.

Карбоплатин, платина, диамино [1,1-циклобутан-дикарбоксилат(2-)-O,O'], является коммерчески доступным как PARAPLATIN® в виде инъекционного раствора. Карбоплатин прежде всего показан в первой и второй линиях лечения карциномы яичника на поздней стадии. Подавление деятельности костного мозга является дозоограничивающей токсичностью карбоплатина.

Алкилирующие агенты являются нефазоспецифичными противоопухолевыми агентами и сильными электрофилами. Обычно алкилирующие агенты путем алкилирования образуют ковалентные связи с ДНК через нуклеофильные группы молекулы ДНК, такие как фосфатные, amino, сульфгидрильные, гидроксильные, карбоксильные и имидазольные группы. Такое алкилирование нарушает функционирование нуклеиновых кислот, приводя к гибели клеток. Примеры алкилирующих агентов включают, но ими не ограничиваются, азотистые иприты, такие как циклофосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; алкилсульфонаты, такие как бусульфан; нитрозомочевины, такие как кармустин; и триазены, такие как дакарбазин.

Циклофосфамид, 2-[бис-(2-хлорэтил)амино]тетрагидро-2H-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксид моногидрат, является коммерчески доступным в виде инъекционного раствора или таблеток как CYTOXAN®. Циклофосфамид показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении злокачественной лимфомы, множественной миеломы и лейкоза. Алопеция, тошнота, рвота и лейкопения являются наиболее распространенными дозоограничивающими побочными эффектами циклофосфамида.

Мелфалан, 4-[бис-(2-хлорэтил)амино]-L-фенилаланин, является коммерчески доступным в виде инъекционного раствора или таблеток как ALKERAN®. Мелфалан показан для паллиативного лечения множественной миеломы и неоперабельного эпителиального рака яичников. Подавление костного мозга является наиболее распространенным дозозависимым побочным эффектом мелфалана.

Хлорамбуцил, 4-[бис-(2-хлорэтил)амино]бензолбутановая кислота, является коммерчески доступным в виде таблеток LEUKERAN®. Хлорамбуцил показан для паллиативного лечения хронического лимфолейкоза и злокачественной лимфомы, такой как лимфосаркома, гигантофолликулярная лимфома и болезнь Ходжкина. Подавление деятельности костного мозга является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом хлорамбуцила.

Бусульфан, 1,4-бутандиол диметансульфонат, является коммерчески доступным в виде таблеток MYLERAN®. Бусульфан показан для паллиативного лечения хронической миелогенной лейкемии. Подавление деятельности костного мозга является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом бусульфана.

Кармустин, 1,3-[бис-(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина, является коммерчески доступным в виде отдельных флаконов с лиофилизированным веществом как Vi-CNU®. Кармустин показан для паллиативного лечения в виде отдельного агента или в комбинации с другими агентами, предназначенными для лечения опухолей мозга, множественной миеломы, болезни Ходжкина и неходжкинской лимфомы. Отсроченная миелосупрессия является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом кармустина.

Дакарбазин, 5-(3,3-диметил-1-триазено)имидазол-4-карбоксамид, является коммерчески доступным в виде отдельных флаконов лиофилизата как DTIC-Dome®. Дакарбазин показан для лечения метастатической злокачественной меланомы и в комбинации с другими агентами при второй линии лечения болезни Ходжкина. Тошнота, рвота и анорексия являются наиболее распространенными дозоограничивающими побочными эффектами дакарбазина.

Антибиотические химиотерапевтические агенты являются нефазоспецифичными агентами, которые связываются с ДНК или интеркалируются в нее. Обычно такое действие приводит к стабильным комплексам ДНК или повреждению цепей, что нарушает обычное функционирование нуклеиновых кислот, приводя к гибели клеток. Примеры антибиотических противоопухолевых агентов включают, но ими не ограничиваются, актиномицины, такие как дактиномицин, антроциклины, такие как даунорубин и доксорубин; и блеомицины.

Дактиномицин, известный также как актиномицин D, является коммерчески доступным в инъекционной форме как COSMEGEN®. Дактиномицин показан для лечения опухоли Вильмса и рабдомиосаркомы. Тошнота, рвота и анорексия являются наиболее распространенными дозоограничивающими побочными эффектами дактиномицина.

Даунорубин, (8S-цис)-8-ацетил-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксид- α -L-ликогексопиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-1-метокси-5,12-нафтацендион гидрохлорид, является коммерчески доступным в виде липосомальной инъекционной формы как DAUNOXOME® или в виде инъекционной формы как CERUBIDINE®. Даунорубин показан для индукции ремиссии при лечении острого нелимфоцитарного лейкоза и прогрессирующего ВИЧ, связанного с саркомой Капоши. Миелосупрессия является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом даунорубина.

Доксорубин, (8S,10S)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксид- α -L-ликогексопиранозил)окси]-8-гликолоил-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-1-метокси-5,12-нафтацендион гидрохлорид, является коммерчески доступным в виде инъекционной формы как RUBEX® или ADRIAMYCIN RDF®. Доксорубин в первую очередь показан для лечения острого лимфобластного лейкоза и острого миелобластного лейкоза, но также может быть полезным компонентом при лечении некоторых солидных опухолей и лимфом. Миелосупрессия является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом доксорубина.

Блеомицин, смесь цитотоксических гликопептидных антибиотиков, выделенный из штаммов *Streptomyces verticillus*, является коммерчески доступным как BLENOXANE®. Блеомицин показан при паллиативном лечении в виде отдельного агента или в комбинации с другими агентами плоскоклеточной карциномы, лимфомы и рака яичника. Легочная и кожная токсичности являются наиболее распространенными дозоограничивающими побочными эффектами блеомицина.

Ингибиторы топоизомеразы II включают, но ими не ограничиваются, эпиподофиллотоксины.

Эпиподофиллотоксины являются фазоспецифичными противоопухолевыми агентами, выделенными из растения мандрагора. Эпиподофиллотоксины обычно воздействуют на клетки в фазах S и G2 клеточного цикла путем образования трехкомпонентных комплексов с топоизомеразой II и ДНК, что приводит к разрывам цепей ДНК. Цепочечные разрывы накапливаются, в результате следует гибель клеток. Примеры эпиподофиллотоксинов включают, но ими не ограничиваются, этопозид и тенипозид.

Этопозид, 4'-деметилэпиподофиллотоксин-9-[4,6-O-(R)-этилиден- β -D-гликопиранозид], является коммерчески доступным в виде инъекционного раствора или капсул как VePESID® и широко известен как VP-16. Этопозид показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении рака яичек и немелкоклеточного рака легких. Миелосупрессия является наиболее распространенным побочным эффектом этопозиды. Случаи лейкопении имеют тенденцию быть более тяжелыми, чем тромбоцитопения.

Тенипозид, 4'-деметилэпиподофиллотоксин-9-[4,6-O-(R)-2-тенилиден]- β -D-гликопиранозид, является

ся коммерчески доступным в виде инъекционного раствора как VUMON® и широко известен как VM-26. Тенипозид показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении острого лейкоза у детей. Миелосупрессия является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом тенипозиды. Тенипозид может вызвать как лейкопению, так и тромбоцитопению.

Относящиеся к новообразованиям антиметаболиты являются фазоспецифичными противоопухолевыми агентами, которые действуют в фазе S (синтез ДНК) клеточного цикла, ингибируя синтез ДНК или ингибируя синтез пуриновых или пиримидиновых оснований, тем самым ограничивая синтез ДНК. В результате, фаза S не протекает, и следует гибель клеток. Примеры относящихся к новообразованиям антиметаболитов включают, но ими не ограничиваются, фторурацил, метотрексат, цитарабин, меркаптопурин, тиогуанин и гемцитабин.

5-Фторурацил, 5-фтор-2,4-(1H,3H)-пиримидиндион, является коммерчески доступным в виде фторурацила. Введение 5-фторурацила приводит к ингибированию синтеза тимидилата и включается также как в РНК, так и в ДНК. Результатом обычно является гибель клеток. 5-фторурацил показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении рака груди, толстой кишки, прямой кишки, желудка и поджелудочной железы. Миелосупрессия и мукозит являются дозоограничивающими побочными эффектами 5-фторурацила. Другие аналоги фторпиримидина включают 5-фтор дезоксиуридин (флосуридин) и 5-фтордезоксидеоксиуридин монофосфат.

Цитарабин, 4-амино-1-β-D-арабинофуранозил-2(1H)-пиримидинон, является коммерчески доступным как CYTOSAR-U® и широко известен как Ага-С. Полагают, что цитарабин проявляет клеточную фазовую специфичность на S-фазе путем ингибирования удлинения цепи ДНК концевым включением цитарабина в растущую цепочку ДНК. Цитарабин показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении острого лейкоза. Другие аналоги цитидина включают 5-азациитидин и 2',2'-дифтордезоксидеоксицитидин (гемцитабин). Цитарабин индуцирует лейкопению, тромбоцитопению и мукозит.

Меркаптопурин, 1,7-дигидро-6H-пуриин-6-тион моногидрат, является коммерчески доступным как PURINETHOL®. Меркаптопурин проявляет клеточную фазовую специфичность на S-фазе путем ингибирования синтеза ДНК по еще неизвестному механизму. Меркаптопурин показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении острого лейкоза. Миелосупрессия и желудочно-кишечный мукозит являются ожидаемыми побочными эффектами меркаптопурина в высокой дозе. Используемым аналогом меркаптопурина является азатиоприн.

Тиогуанин, 2-амино-1,7-дигидро-6H-пуриин-6-тион, является коммерчески доступным как TABLOID®. Тиогуанин проявляет клеточную фазовую специфичность на S-фазе путем ингибирования синтеза ДНК по еще неизвестному механизму. Тиогуанин показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении острого лейкоза. Миелосупрессия, включая лейкопению, тромбоцитопению и анемию, является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом введения тиогуанина. Однако встречаются желудочно-кишечные побочные эффекты, что может являться дозоограничивающим. Другие аналоги пурина включают пентостатин, эритрогидроксиниладенин, флударабин фосфат и кладрибин.

Гемцитабин, 2'-дезоксидеокси-2',2'-дифторцитидин моногидрохлорид (β-изомер), является коммерчески доступным как GEMZAR®. Гемцитабин проявляет клеточную фазовую специфичность на S-фазе путем блокирования прогрессирования клеток через границу G1/S. Гемцитабин показан в комбинации с цисплатином при лечении локального прогрессирующего немелкоклеточного рака легкого и отдельно при лечении локального прогрессирующего рака поджелудочной железы. Миелосупрессия, включая лейкопению, тромбоцитопению и анемию, является наиболее распространенным дозоограничивающим побочным эффектом введения гемцитабина.

Метотрексат, N-[4[[[2,4-диамино-6-птеридинил)метил]-метиламино]бензоил]-L-глутаминовая кислота, является коммерчески доступным как метотрексат натрия. Метотрексат проявляет клеточную фазовую специфичность на S-фазе путем ингибирования синтеза ДНК, репарации и/или репликации через ингибирование дигидрофолиевой редуктазы, которая необходима для синтеза пуриновых нуклеотидов и тимидилата. Метотрексат показан в виде отдельного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами при лечении хориокарциномы, менингеального лейкоза, неходжкинской лимфомы и рака груди, головы, шеи, яичника и мочевого пузыря. Миелосупрессия (лейкопения, тромбоцитопения и анемия) и мукозит являются ожидаемыми побочными эффектами введения метотрексата.

Камптотецины, включая камптотецин и производные камптотецина, являются доступными или находятся в стадии разработки в качестве ингибиторов топоизомеразы I. Полагают, что цитотоксическая активность камптотецинов должна быть связана с его ингибирующей топоизомеразу I активностью. Примеры камптотецинов включают, но этим не ограничиваются, иринотекан, топотекан и различные оптические формы 7-(4-метилпиперазино-метил)-10,11-этилендиокси-20-камптотецина, описанного далее.

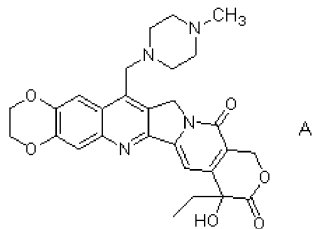
Иринотекан HCl, (4S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-9-[(4-пиперидинопиперидино)карбонилокси]-1H-

пирано[3',4',6,7]-индолизино[1,2-b]хинолин-3,14(4H,12H)-дион гидрохлорид, является коммерчески доступным в виде инъекционного раствора CAMPTOSAR®.

Иринотекан является производным камптотецина, который связывается вместе с его активным метаболитом SN-38 с комплексом топоизомеразы I-ДНК. Считается, что эта цитотоксичность возникает в результате непоправимых разрывов двух нитей, вызванных взаимодействием тройного комплекса топоизомеразы I:ДНК:иринотекан или SN-38 с ферментами репликации. Иринотекан показан для лечения метастатического рака толстой кишки или прямой кишки. Ограничивающие дозу побочные эффекты иринотекана HCl представляют собой миелосупрессию, включая нейтропению и эффекты GI, включая диарею.

Топотекан HCl, (S)-10-[(диметиламино)метил]-4-этил-4,9-дигидрокси-1H-пирано[3',4',6,7]-индолизино[1,2-b]хинолин-3,14-(4H,12H)-дион моногидрохлорид, является коммерчески доступным в виде раствора для инъекций HUCAMTIN®. Топотекан представляет собой производное камптотецина, которое связывается с комплексом топоизомеразы I-ДНК и предотвращает повторение разрывов одиночной нити, вызванных топоизомеразой I, в ответ на деформацию скручивания молекулы ДНК. Топотекан показан для второй линии лечения метастатической карциномы яичника и мелкоклеточного рака легкого. Ограничивающий дозу побочный эффект топотекана HCl представляет собой миелосупрессию, прежде всего нейтропению.

Также представляет интерес производное камптотецина формулы А, включая форму рацемической смеси (R,S), а также R- и S-энантиомеры:



известное под химическим названием "7-(4-метилпиперазино-метил)-10,11-этилендиокси-20(R,S)-камптотекан (рацемическая смесь)", или "7-(4-метилпиперазино-метил)-10,11-этилендиокси-20(R)-камптотекан (R энантиомер)", или "7-(4-метилпиперазино-метил)-10,11-этилендиокси-20(S)-камптотекан (S энантиомер)". Такие соединения, а также связанные соединения описаны, включая способы получения, в патентах США № 6063923, 5342947, 5559235 и 5491237.

Гормоны и аналоги гормонов являются полезными соединениями для лечения злокачественных новообразований, где имеется взаимосвязь между гормоном(ами) и ростом и/или отсутствием роста злокачественного новообразования. Примеры гормонов и аналогов гормонов, которые могут быть использованы при лечении злокачественных новообразований, включают, но ими не ограничиваются, адренокортикостероиды, такие как преднизон и преднизолон, которые могут быть использованы при лечении злокачественной лимфомы и острого лейкоза у детей; аминоклутетимид и другие ингибиторы ароматазы, такие как анастрозол, летразол, воразол и экземестан, которые могут быть использованы при лечении адренокортикальной карциномы и гормонозависимой карциномы молочной железы, содержащей рецепторы эстрогена; прогестрины, такие как мегестрола ацетат, который может быть использован при лечении гормонозависимого рака молочной железы и карциномы эндометрия; эстрогены, андрогены и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, ципротерона ацетат и 5 α -редуктаза, такая как финастерид и дутастерид, которые могут быть использованы при лечении карциномы предстательной железы и доброкачественной гиперплазии предстательной железы; антиэстрогены, такие как тамоксифен, торемифен, ралоксифен, дролоксифен и йодоксифен, а также селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (СМЭР), например, описанные в патентах США № 5681835, 5877219 и 6207716, которые могут быть использованы при лечении гормонозависимой карциномы молочной железы; и гонадотропин-рилизинг-гормон (GnRH) и его аналоги, которые стимулируют высвобождение лютеинизирующего гормона (LH) и/или фолликулостимулирующего гормона (FSH), для лечения карциномы предстательной железы, например, агонисты и антагонисты LHRH, такие как гoserелина ацетат и люпролид.

Ингибиторы путей сигнальной трансдукции представляют собой такие ингибиторы, которые блокируют или ингибируют химический процесс, вызывающий внутриклеточное изменение. Как используется в настоящем документе, это изменение представляет собой клеточную пролиферацию или дифференцировку. Ингибиторы сигнальной трансдукции, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, нерецепторных тирозинкиназ, блокаторов SH2/SH3-доменов, серин/треониновых киназ, фосфатидил-инозитол-3-киназ, миозин-инзитол-сигналинга и Ras-онкогенов.

Некоторые протеин-тирозинкиназы катализируют фосфорилирование специфических тирозиновых остатков в различных белках, вовлеченных в регуляцию клеточного роста. Такие протеин-тирозинкиназы могут быть широко классифицированы как рецепторные или нерецепторные киназы.

Рецепторные тирозинкиназы представляют собой трансмембранные белки, имеющие внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный домен и тирозинкиназный домен. Рецепторные тирозинкиназы вовлечены в регуляцию клеточного роста, и их обычно называют рецепторами ростовых факторов. Было показано, что неподходящая или неконтролируемая активация многих этих киназ, т.е. aberrантная киназная рецепторная активность в отношении ростовых факторов, например, посредством сверхэкспрессии или мутации, приводит к неконтролируемому клеточному росту. Соответственно, aberrантную активность таких киназ связывали с ростом злокачественных тканей. Поэтому ингибиторы таких киназ могли бы обеспечивать способы лечения злокачественных новообразований. Рецепторы факторов роста включают, например, рецептор фактора эпидермального роста (EGFr, ErbB2 и ErbB4), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFr), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), тирозинкиназу с доменами, гомологичными иммуноглобулиноподобному и эпидермальному ростовому фактору, (TIE-2), рецептор инсулинового ростового фактора-I (IGF-I), макрофаг-колониестимулирующий фактор (cfms), BTK, skit, cmet, рецепторы фактора роста фибробластов (FGF), Trk-рецепторы (TrkA, TrkB и TrkC), эфрин-рецепторы (eph) и RET-протоонкогены. Некоторые ингибиторы рецепторов факторов роста находятся в стадии разработки и включают антагонисты лигандов, антитела, ингибиторы тирозинкиназ и антисмысловые олигонуклеотиды. Рецепторы факторов роста и агенты, ингибирующие функционирование рецепторов факторов роста, описаны, например, в работах Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000), 10(6):803-818; Shawver et al., DDT Vol. 2, No. 2, February 1997; и Loftis, F.J. et al., "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, London.

Соответственно, фармацевтически активные соединения по изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибитором VEGFR, например 5-[[4-[(2,3-диметил-2H-индазол-6-ил)метиламино]-2-пиримидинил]амино]-2-метилбензолсульфонамидом или его фармацевтически приемлемой солью, например моногидрохлоридной солью, которые раскрыты и заявлены в международной заявке № PCT/US01/49367 с датой международной подачи 19 декабря 2001 г., международной публикации № WO 02/059110 и международной публикации от 1 августа, 2002 г., полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки и которое является соединением по примеру 69. 5-[[4-[(2,3-Диметил-2H-индазол-6-ил)метиламино]-2-пиримидинил]амино]-2-метилбензолсульфонамид может быть получен, как описано в международной заявке № PCT/US01/49367.

Подходящим образом 5-[[4-[(2,3-диметил-2H-индазол-6-ил)метиламино]-2-пиримидинил]амино]-2-метилбензолсульфонамид представлен в виде моногидрохлоридной соли. Эта солевая форма может быть получена специалистом в данной области в соответствии с описанием международной заявки № PCT/US01/49367, с датой международной подачи от 19 декабря 2001 г.

5-[[4-[(2,3-Диметил-2H-индазол-6-ил)метиламино]-2-пиримидинил]амино]-2-метилбензолсульфонамид продается на коммерческой основе в виде моногидрохлоридной соли и известен под общим названием пазопаниб и торговым названием Votrient®.

Пазопаниб участвует в лечении злокачественных новообразований и глазных заболеваний/ангиогенеза.

Соответственно, настоящее изобретение относится к лечению злокачественных новообразований и глазных заболеваний/ангиогенеза, например возрастной макулярной дегенерации, которое включает введение соединения формулы (I) отдельно или в сочетании с пазопанибом.

Тирозинкиназы, которые не являются рецепторными киназами факторов роста, называются нерецепторными тирозинкиназами. Нерецепторные тирозинкиназы, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, являющиеся мишенями или потенциальными мишенями противоопухолевых лекарств, включают cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (киназа фокальной адгезии), Brutons-тирозинкиназу и Vcr-Abl. Такие нерецепторные киназы и агенты, ингибирующие функционирование нерецепторных тирозинкиназ, описаны в работах Sinn, S. and Corey, S.J., (1999), Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research, 8(5):465-80 и Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997), Annual review of Immunology. 15:371-404.

Блокаторы SH2/SH3-доменов представляют собой агенты, которые нарушают связывание с SH2-или SH3-доменами у ряда ферментов или адапторных белков, включая PI3-K p85 субъединицу, Src-киназное семейство, адапторные молекулы (Shc, Crk, Nek, Grb2) и Ras-GAP. SH2/SH3-домены как мишени для противоопухолевых лекарств обсуждались в работе Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 34(3):125-32.

Ингибиторы серин/треониновых киназ включают блокаторы MAP-киназного каскада, включающие блокаторы Raf-киназ (rafk), митоген- или внеклеточные регулируемые киназы (MEK) и внеклеточные регулируемые киназы (ERK); и блокаторы семейства протеинкиназ C, в том числе блокаторы подтипов PKC (альфа, бета, гамма, эпсилон, мю, лямбда, йота, зета), IкВ-киназного семейства (IкKa, IкKb), киназ PKB-семейства, членов семейства Akt-киназ и TGF-бета-рецепторных киназ. Такие серин/треониновые киназы и их ингибиторы описаны в работах Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126(5):799-803; Brodt, P., Samani, A., and Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996), Cancer Surveys. 27:41-64; Philip, P.A., and Harris, A.L.

(1995), *Cancer Treatment and Research*. 78:3-27, Lackey, K. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (10), 2000, 223-226; патент США № 6268391; Pearce, L.R et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010) 11, 9-22; и Martinez-Iacaci, L., et al., *Int. J. Cancer* (2000), 88(1), 44-52.

Соответственно, фармацевтически активные соединения по изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибитором MEK, например N-{3-[3-циклопропил-5-(2-фтор-4-йод-фениламино)-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиридо[4,3-d]пиримидин-1-ил]фенил}ацетамидом или его фармацевтически приемлемыми солями или сольватом, например диметилсульфоксид сольватом, которые описаны и заявлены в международной заявке № PCT/JP2005/011082 с датой международной подачи от 10 июня 2005 г; международной публикации номер WO 2005/121142 и международной публикации с датой от 22 декабря 2005 г, полное описание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

N-{3-[3-Циклопропил-5-(2-фтор-4-йод-фениламино)-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиридо[4,3-d]пиримидин-1-ил]фенил}ацетамид может быть получен, как описано в патентной публикации Соединенных Штатов № US 2006/0014768, опубликованной 19 января 2006 г., полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Соответственно, фармацевтически активные соединения по изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибитором B-Raf, например N-{3-[5-(2-амино-4-пиримидинил)-2-(1,1-диметилэтил)-1,3-тиазол-4-ил]-2-фторфенил}-2,6-дифторбензолсульфонамидом или его фармацевтически приемлемой солью, которые описаны и заявлены в международной заявке № PCT/US2009/042682 с датой международной подачи от 4 мая 2009 г., полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

N-{3-[5-(2-Амино-4-пиримидинил)-2-(1,1-диметилэтил)-1,3-тиазол-4-ил]-2-фторфенил}-2,6-дифторбензолсульфонамид может быть получен, как описано в международной заявке № PCT/US2009/042682.

Соответственно, фармацевтически активные соединения по изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибитором Akt, например N-{(1S)-2-амино-1-[(3,4-дифторфенил)метил]этил}-5-хлор-4-(4-хлор-1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-фуранкарбоксамидом или его фармацевтически приемлемой солью, которые описаны и заявлены в международной заявке № PCT/US2008/053269 с датой международной подачи от 7 февраля 2008 г.; международной публикации номер WO 2008/098104 и международной публикации с датой от 14 августа 2008 г., полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. N-{(1S)-2-Амино-1-[(3,4-дифторфенил)метил]этил}-5-хлор-4-(4-хлор-1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-фуранкарбоксамид является соединением по примеру 224 и может быть получен, как описано в международной заявке № PCT/US2008/053269.

Соответственно, фармацевтически активные соединения по изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибитором Akt, например, N-{(1S)-2-амино-1-[(3-фторфенил)метил]этил}-5-хлор-4-(4-хлор-1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-тиофенкарбоксамидом или его фармацевтически приемлемой солью, которые описаны и заявлены в международной заявке № PCT/US2008/053269 с датой международной подачи от 7 февраля 2008 г.; международной публикации номер WO 2008/098104 и международной публикации с датой от 14 августа 2008 г., полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. N-{(1S)-2-Амино-1-[(3-фторфенил)метил]этил}-5-хлор-4-(4-хлор-1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-тиофенкарбоксамид является соединением по примеру 96 и может быть получен, как описано в международной заявке № PCT/US2008/053269. Например, N-{(1S)-2-амино-1-[(3-фторфенил)метил]этил}-5-хлор-4-(4-хлор-1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-тиофенкарбоксамид представлен в виде гидрохлоридной соли. Солевая форма может быть получена специалистом в данной области в соответствии с описанием международной заявки № PCT/US2010/022323, с датой международной подачи от 28 января 2010 г.

Ингибиторы членов семейства фосфотидилинозитол-3 киназ, включая блокаторы PI3-киназы, aTM, DNA-PK и Ku также могут быть использованы по настоящему изобретению. Такие киназы обсуждаются в работах Abraham, R.T. (1996), *Current Opinion in Immunology*. 8(3):412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), *Oncogene*, 17(25):3301-3308; Jackson, S.P. (1997), *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29(7):935-8; и Zhong, H. et al., *Cancer res*, (2000), 60(6), 1541-1545.

Также в соответствии с настоящим изобретением интерес представляют ингибиторы действия миоинозитола на работу сигнальных путей, такие как блокаторы фосфолипазы C и аналоги миоинозитола. Такие ингибиторы сигнальных путей описаны Powis, G., and Kozikowski A. (1994), *New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed.*, Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London.

Другой группой ингибиторов путей сигнальной трансдукции являются ингибиторы Ras-онкогенов. Такие ингибиторы включают ингибиторы фарнезилтрансферазы, геранил-геранил-трансферазы и СААХ-протеаз, а также антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы и иммунотерапию. Было показано, что такие ингибиторы блокируют активацию Ras в клетках, содержащих мутантный Ras дикого типа, действуя таким образом как антипролиферативные агенты. Ингибирование Ras-онкогенов обсуждалось в работах Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), *Journal of Biomedical Science*. 7(4):292-8; Ashby, M.N. (1998), *Current Opinion in Lipidology*. 9(2):99-102; и BioChim. Biophys. Acta, (1999, 1423(3):19-30.

Как упомянуто выше, антитела против лигандсвязывающей рецепторной киназы также могут слу-

жить в качестве ингибиторов сигнальной трансдукции. Эта группа ингибиторов путей сигнальной трансдукции включает применение гуманизированных антител против внеклеточного лигандсвязывающего домена рецепторной тирозинкиназы. Например, Imclone C225 EGFR-специфическое антитело (см. Green, M.C. et al., *Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors*, *Cancer Treat. Rev.* (2000), 26(4), 269-286); Herceptin® erbB2-антитело (смотри *Tyrosine Kinase Signaling in Breast Cancer: ErbB Family Receptor Tyrosine Kinase*, *Breast Cancer Res.*, 2000, 2(3), 176-183); и 2CB VEGFR2-специфическое антитело (см. Brekken, R.A. et al., *Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a Monoclonal Anti-VEGF Antibody Blocks Tumor Growth in Mice*, *Cancer Res.* (2000), 60, 5117-5124).

Ингибиторы ангиогенеза нерцепторных киназ также могут найти применение по настоящему изобретению. Ингибиторы ангиогенеза, связанные с VEGFR и TIE2, рассмотрены выше в отношении ингибиторов сигнальной трансдукции (оба рецептора являются рецепторными тирозинкиназами). Показано, что ангиогенез главным образом связан с сигнализацией erbB2/EGFR, поскольку ингибиторы erbB2 и EGFR, как было показано, ингибируют ангиогенез, в первую очередь экспрессию VEGF. Соответственно, ингибиторы нерцепторной тирозинкиназы могут быть использованы в комбинации с соединениями по настоящему изобретению. Например, анти-VEGF-антитела, которые не распознают VEGFR (рецепторная тирозинкиназа), однако связываются с лигандом; низкомолекулярные ингибиторы интегрина (альфа, бета), которые будут ингибировать ангиогенез; эндостатин и ангиостатин (не-RTK) также могут демонстрировать полезность в комбинации с описанными соединениями. (См., Bruns C.J. et al. (2000), *Cancer Res.*, 60:2926-2935; Schreiber A.B., Winkler M.E., and Derynck R. (1986), *Science*, 232:1250-1253; Yen L et al. (2000), *Oncogene*, 19:3460-3469).

Агенты, используемые в иммунотерапевтических схемах лечения, также могут быть использованы в комбинации с соединениями формулы (I). Существует ряд иммунологических стратегий для создания иммунного ответа. Эти стратегии, как правило, относятся к области вакцинации опухолей. Эффективность иммунологических подходов может быть значительно усилена за счет комбинированного ингибирования сигнальных путей с использованием ингибитора малых молекул. Обсуждение подхода с помощью иммунологической/опухолевой вакцины против erbB2/EGFR представлено в работе Reilly R.T. et al. (2000), *Cancer Res.* 60:3569-3576.

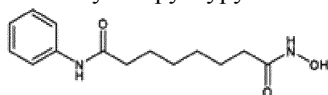
Агенты, используемые в проапоптотических схемах лечения (например, bcl-2 антисмысловые олигонуклеотиды), также могут быть использованы в комбинации по настоящему изобретению. Члены Bcl-2-семейства белков блокируют апоптоз. Поэтому повышенная регуляция bcl-2 была связана с хемотерапевтической резистентностью. Исследования показали, что эпидермальный фактор роста (EGF) стимулирует антиапоптотические члены bcl-2-семейства (т.е. mcl-1). Поэтому стратегии, разработанные с целью негативного регулирования экспрессии bcl-2 в опухолях, продемонстрировали благоприятное воздействие в клинике и в настоящее время проходят фазу II/III испытаний, а именно G3139 bcl-2-антисмысловой олигонуклеотид. Такие проапоптотические стратегии, использующие методологию применения антисмысловых олигонуклеотидов к bcl-2, были рассмотрены в работе Waters J.S. et al. (2000), *J. Clin. Oncol.* 18:1812-1823.

Ингибиторы сигнального клеточного цикла ингибируют молекулы, вовлеченные в контролирование клеточного цикла. Семейство протеинкиназ, называемых циклин-зависимыми киназами (CDK), и их взаимодействие с семейством белков, называемых циклинами, контролирует ход всего клеточного цикла у эукариот. Координация между активацией и инактивацией различных комплексов циклин/CDK необходима для нормального хода всего клеточного цикла. Несколько ингибиторов передачи сигналов клеточного цикла находятся в стадии разработки. Например, примеры циклин-зависимых киназ, включая CDK2, CDK4 и CDK6, и их ингибиторы описаны, например, Rosania et al., *Exp. Opin. Ther. Patents* (2000), 10(2):215-230. Кроме того, p21WAF1/CIP1 был описан как возможный и универсальный ингибитор циклин-зависимой киназы (Cdk) (Ball et al., *Progress in Cell Cycle Res.*, 3:125 (1997)). Соединения, которые, как известно, индуцируют экспрессию p21WAF1/CIP1, были вовлечены в подавление пролиферации клеток и проявляют подавляющую опухоль активность (Richon et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 97(18):10014-10019 (2000)), и включены в качестве ингибиторов сигнализации клеточного цикла. Ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC) участвуют в транскрипционной активации p21WAF1/CIP1 (Vigushin et al., *Anticancer Drugs*, 13(1):1-13 (Jan 2002)), и являются подходящими ингибиторами сигнализации клеточного цикла для применения в комбинации по настоящему документу.

Примеры таких ингибиторов HDAC включают следующее.

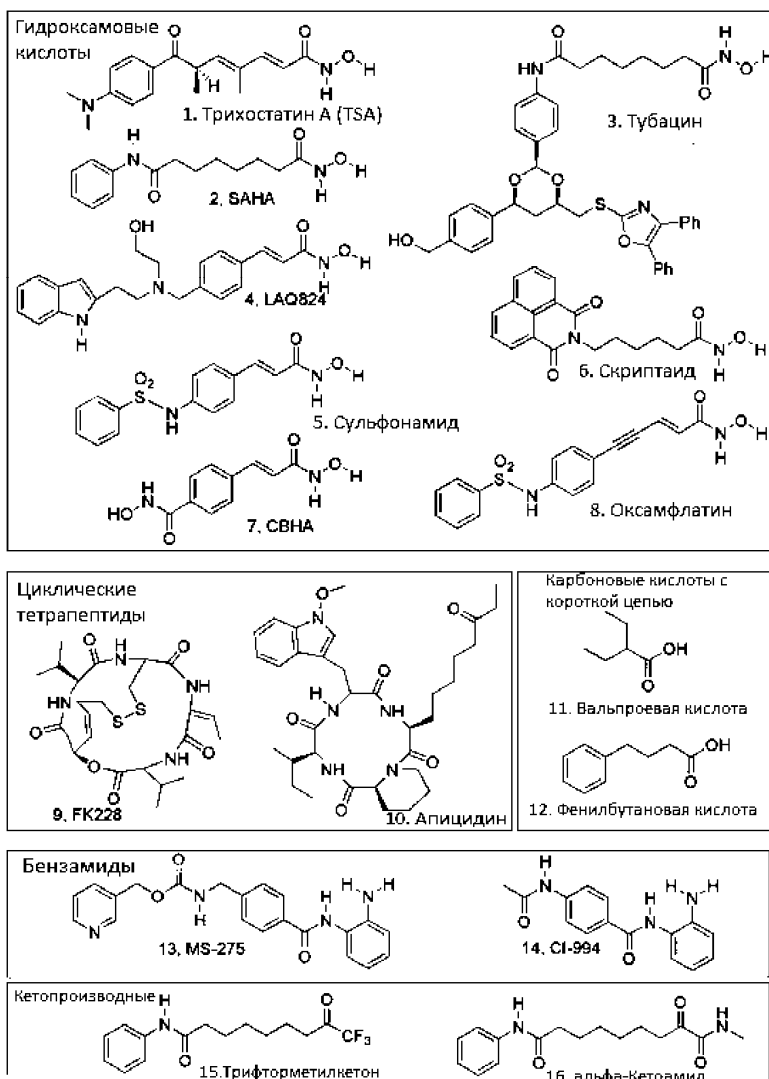
1. Вориностат, включая его фармацевтически приемлемые соли. Marks et al., *Nature Biotechnology*, 25, 84-90 (2007); Stenger, *Community Oncology*, 4, 384-386 (2007).

Вориностат имеет следующую химическую структуру и название:



N-гидрокси-N'-фенил-октандиамид

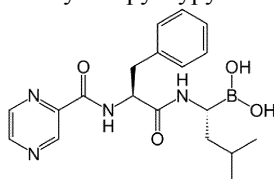
2. Ромидепсин, включая его фармацевтически приемлемые соли. Vinodhkumar et al., *Biomedicine &*



Ингибиторы протеасом представляют собой лекарственные средства, которые блокируют действие протеасом, клеточных комплексов, которые разрушают белки, такие как белок p53. Некоторые ингибиторы протеасом являются коммерчески доступными или изучаются при лечении рака. Подходящие ингибиторы протеасом для использования в комбинации по настоящему документу включают следующее.

1. Bortezomib (Velcade®), включая его фармацевтически приемлемые соли. Adams J., Kauffman M. (2004), *Cancer Invest.* 22 (2):304-11.

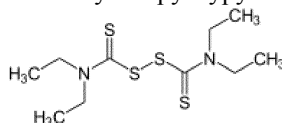
Бортезомиб имеет следующую химическую структуру и название:



[(1R)-3-метил-1-((2S)-3-фенил-2-[(пирозин-2-илкарбонил)амино]пропаноил)амино)бутил]борная кислота

2. Дисульфирам, включая его фармацевтически приемлемые соли. Vouma et al. (1998). *J. Antimicrob. Chemother.* 42(6):817-20.

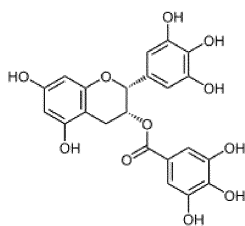
Дисульфирам имеет следующую химическую структуру и название:



1,1',1''-[дисульфандиил-бис-(карбонотионилнитрило)]тетраэтан

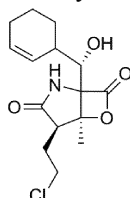
3. Эпигаллокатехин галлат (EGCG), включая его фармацевтически приемлемые соли. Williamson et al. (December 2006), *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(6):1369-74.

Эпигаллокатехин галлат имеет следующую химическую структуру и название:



[(2R,3R)-5,7-дигидрокси-2-(3,4,5-тригидроксифенил)хроман-3-ил]-3,4,5-тригидроксибензоат
4. Салиноспорамид А, включая его фармацевтически приемлемые соли. Feling et al. (2003), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42(3):355-7.

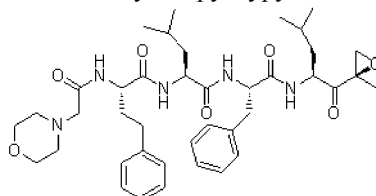
Салиноспорамид А имеет следующую химическую структуру и название:



(4R,5S)-4-(2-хлорэтил)-1-((1S)-циклогекс-2-енил(гидрокси)метил)-5-метил-6-окса-2-азабицикло[3,2,0]гептан-3,7-дион

5. Карфилзомиб, включая его фармацевтически приемлемые соли. Kuhn D.J., et al., *Blood*, 2007, 110:3281-3290.

Карфилзомиб имеет следующую химическую структуру и название:

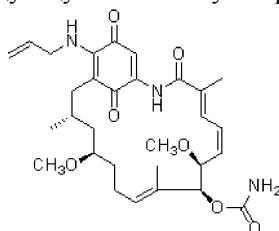


(S)-4-метил-N-((S)-1-(((S)-4-метил-1-((R)-2-метилоксиран-2-ил)-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)-2-((S)-2-(2-морфолиноацетиамидо)-4-фенилбутанамидо)пентанамид

Белки теплового шока с массой 70 кДа (Hsp70) и белки теплового шока с массой 90 кДа (Hsp90) являются семейством повсеместно экспрессируемых белков теплового шока. Hsp70 и Hsp90 сверхэкспрессируются в некоторых злокачественных опухолях. Использование некоторых ингибиторов Hsp70 и Hsp90 при лечении рака изучается. Подходящие ингибиторы Hsp70 и Hsp90 для использования в комбинации по настоящему документу включают следующие.

1. 17-ААГ(Гелданамицин), включая его фармацевтически приемлемые соли. Jia W et al., *Blood*. 2003 Sep 1; 102(5):1824-32.

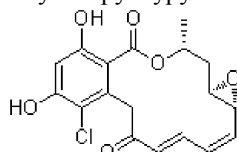
17-ААГ(Гелданамицин) имеет следующую химическую структуру и название:



17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин

2. Радицикол, включая его фармацевтически приемлемые соли. (Lee et al., *Mol. Cell Endocrinol.* 2002, 188, 47-54)

Радицикол имеет следующую химическую структуру и название:



(1aR,2Z,4E,14R,15aR)-8-хлор-9,11-дигидрокси-14-метил-15,15a-дигидро-1aH-бензо[с]оксирено[2,3-k][1]оксациклотетрадецин-6,12(7H,14H)-дион

Ингибиторы ракового метаболизма.

Многие опухолевые клетки демонстрируют метаболизм, заметно отличающийся от метаболизма нормальных тканей. Например, скорость гликолиза, метаболического процесса, который превращает

глюкозу в пируват, увеличивается, и полученный пируват восстанавливается до лактата, а не подвергается дополнительному окислению в митохондриях через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Этот эффект часто наблюдается даже в аэробных условиях и известен как эффект Варбурга.

Лактатдегидрогеназа А (LDH-A), изоформа лактатдегидрогеназы, экспрессируемая в мышечных клетках, играет ключевую роль в метаболизме опухолевых клеток, осуществляя восстановление пирувата до лактата, который затем может быть выведен из клетки. Показано, что фермент активируется во многих типах опухолей. Изменение метаболизма глюкозы, описанное как эффект Варбурга, имеет решающее значение для роста и пролиферации раковых клеток, и, как было показано, снижение уровня LDH-A с использованием РНК-и приводит к снижению пролиферации клеток и росту опухоли на моделях ксенотрансплантатов.

D.A. Tennant et al., *Nature Reviews*, 2010, 267.

P. Leder, et al., *Cancer Cell*, 2006, 9, 425.

При предраковых заболеваниях были обнаружены высокие уровни синтазы жирных кислот (FAS). Фармакологическое ингибирование FAS влияет на экспрессию ключевых онкогенов, участвующих в развитии и поддержании злокачественного новообразования. Alli et al., *Oncogene*, (2005), 24, 39-46. doi: 10.1038.

Ингибиторы ракового метаболизма, включая ингибиторы LDH-A и ингибиторы биосинтеза жирных кислот (или ингибиторы FAS), являются подходящими для использования в комбинации с соединениями по настоящему изобретению.

Дополнительными примерами добавочного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевый агент) для использования в комбинации или для совместного введения с предложенными в настоящем изобретении ингибирующими CD73 соединениями являются анти-PD-L1 агенты.

Антитела против PD-L1 и способы их получения известны в данной области техники.

Такие антитела к PD-L1 могут быть поликлональными или моноклональными, и/или рекомбинантными, и/или гуманизированными.

Примеры PD-L1 антител описаны:

патент США № 8217149; 12/633339;

патент США № 8383796; 13/091936;

патент США № 8552154; 13/120406;

патентная публикация США № 20110280877; 13/068337;

патентная публикация США № 20130309250; 13/892671;

WO 2013/019906;

WO 2013079174;

заявка США № 13/511538 (подана 7 августа 2012 г. которая является национальной фазой США международной заявки № PCT/US10/58007 (подана 2010 г.); и заявка США № 13/478511 (подана 23 мая 2012 г.).

Дополнительные примеры антител к PD-L1 (также указываемые как CD274 или B7-H1) и способы применения описаны в патенте США № 7943743; US20130034559, WO2014055897, патенте США № 8168179 и патенте США № 7595048. PD-L1 антитела находятся на стадии разработки в качестве иммуномодулирующих агентов для лечения злокачественного новообразования.

В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой антитело, описанное в патенте США № 8217149. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 содержит CDR антитела, описанные в патенте США № 8217149.

В другом варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой антитело, описанное в заявке США № 13/511538. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 содержит CDR антитела, описанные в заявке США № 13/511538.

В другом варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой антитело, описанное в заявке № 13/478511. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 содержит CDR антитела, описанные в заявке США № 13/478511.

В одном варианте осуществления антитело против PD-L1 представляет собой BMS-936559 (MDX-1105). В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 представляет собой MPDL3280A (RG7446). В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 представляет собой MEDI4736.

Дополнительным примером добавочного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевый агент) для использования в комбинации или для совместного введения с предложенными в настоящем изобретении ингибирующими CD73 соединениями является антагонист PD-1.

"Антагонист PD-1" означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая блокирует связывание PD-L1, экспрессируемого в раковой клетке, с PD-1, экспрессируемым в иммунной клетке (Т-клетке, В-клетке или НКТ-клетке) и, предпочтительно, блокирует также связывание PD-L2, экспрессируемого в раковой клетке, с PD-1, экспрессируемым в иммунной клетке. Альтернативные названия или синонимы для PD-1 и его лигандов включают PDCD1, PD1, CD279 и SLEB2 для PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 и B7-H для PD-L1 и PDCD1L2, PDL2, B7-DC, B7-1 и CD273 для PD-L2. В вариантах осуществления аспектов или вариантов осуществления по настоящему изобретению,

при которых необходимо лечение человека, антагонист PD-1 блокирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека и предпочтительно блокирует связывание как PD-L1 человека, так и PD-L2 человека с PD-1 человека. Описание аминокислотных последовательностей PD-1 человека можно найти в NCBI Locus №: NP_005009. Описание аминокислотных последовательностей PD-L1 и PD-L2 человека можно найти в NCBI Locus №: NP_054862 и NP_079515 соответственно.

Антагонисты PD-1, которые могут быть использованы в любых аспектах настоящего изобретения, включают моноклональное антитело (mAb) или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 или PD-L1 и, предпочтительно, специфически связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека. mAb может быть человеческим антителом, гуманизированным антителом или химерным антителом и может включать константную область человека. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела человека выбрана из группы, состоящей из константных областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и в предпочтительных вариантах константная область антитела человека представляет собой константную область IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv и Fv.

Примеры mAb, которые связываются с PD-1 человека и могут быть использованы в различных аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения, описаны в US 7488802, US 7521051, US 8008449, US 8354509, US 8168757, WO 2004/004771, WO 2004/072286, WO 2004/056875 и US 2011/0271358.

Специфические античеловеческие PD-1 mAb, используемые в качестве антагониста PD-1 в любых аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения, включают МК-3475, гуманизированное IgG4 mAb со структурой, описанной в WHO Drug Information, Vol. 27, № 2, 161-162 (2013), и которое содержит аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, показанные на фиг. 6; ниволумаб, человеческий IgG4 mAb со структурой, описанной в WHO Drug Information, Vol. 27, № 1, 68-69 (2013), и который содержит аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, показанные на фиг. 7; гуманизированные антитела h409A11, h409A16 и h409A17, которые описаны в WO 2008/156712, и AMP-514, разрабатываемый Medimmune.

Другие антагонисты PD-1, используемые в любых аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения, включают иммуноадгезии, который специфически связывается с PD-1 и предпочтительно специфически связывается с PD-1 человека, например слитый белок, содержащий внеклеточную или PD-1 связывающую часть PD-L1 или PD-L2, слитую с константной областью, такой как Fc-область молекулы иммуноглобулина. Примеры иммуноадгезионных молекул, которые специфически связываются с PD-1, описаны в WO 02010/027827 и WO 2011/066342. Конкретные слитые белки, используемые в качестве антагониста PD-1 в способе лечения, лекарственных средствах и применениях по настоящему изобретению, включают AMP-224 (также известный как B7-DCIg), который представляет собой слитый белок PD-L2-Fc и связывается с PD-1 человека.

Других примеры mAb, которые связываются с PD-1 человека и могут быть использованы в способе лечения, лекарственных средствах и применениях по настоящему изобретению, описаны в WO 2013/019906, WO 2010/077634 A1 и US 8383796. Специфические античеловеческие PD-L1 mAb, которые могут быть использованы в качестве антагониста PD-1 в способе лечения, лекарственных средствах и применениях по настоящему изобретению, включают MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB0010718C.

Кейтруда/пембролизумаб представляет собой антитело против PD-1, продаваемое компанией Merck для лечения рака легких. Аминокислотная последовательность пембролизумаба и способы его применения раскрыты в патенте США № 8168757.

Опдиво/ниволумаб является полностью человеческим моноклональным антителом, продаваемым компанией Bristol Myers Squibb, направленным против рецептора отрицательной иммунной регуляции PD-1 на поверхности клеток человека (программируемая смерть-1 или программируемая гибель клеток-1/PCD-1), обладающим иммунопотенцирующей активностью. Ниволумаб связывает и блокирует активацию PD-1, трансмембранного белка суперсемейства Ig, его лигандами PD-L1 и PD-L2, что приводит к активации Т-клеток и опосредуемых клетками иммунных ответов против опухолевых клеток или патогенов. Активированный PD-1 отрицательно регулирует активацию и эффекторную функцию Т-клеток посредством подавления активации пути P13k/Акт. Другие названия ниволумаба включают BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538. Аминокислотная последовательность ниволумаба и способы применения и получения раскрыты в патенте США № US 8008449.

Дополнительными примерами добавочного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевый агент) для использования в комбинации или для совместного введения с предложенными в настоящем изобретении ингибирующими CD73 соединениями являются иммуномодуляторы.

Как используется в настоящем документе, термин "иммуномодуляторы" относится к веществу, включая моноклональные антитела, которые поражают иммунную систему. Связывающие белки ICOS по настоящему изобретению можно рассматривать как иммуномодуляторы. Иммуномодуляторы могут быть использованы в качестве противоопухолевых средств для лечения злокачественного новообразования. Например, иммуномодуляторы включают, но не ограничиваются ими, антитела против CTLA-4,

такие как ипилимумаб (EPВОЙ) и антитела против PD-1 (опдиво/ниволумаб и кейтруда/пембролизумаб). Другие иммуномодуляторы включают, но не ограничиваются ими, OX-40 антитела, PD-L1 антитела, LAG3 антитела, TIM-3 антитела, 41BB антитела и GITR антитела.

Ервой (ипилимумаб) является полностью человеческим CTLA-4 антителом, продаваемым компанией Bristol Myers Squibb. Белковая структура ипилимумаба и способы применения описаны в патентах США № 6984720 и 7605238.

CD134, также известный как антитело к OX40, является членом TNFR-суперсемейства рецепторов, который не экспрессируется конститутивно на дремлющих наивных Т-клетках, в отличие от CD28. Антитело к OX40 представляет собой вторичную костимулирующую молекулу, экспрессируемую через 24-72 ч после активации; ее лиганд, антитело к OX40, также не экспрессируется на дремлющих антиген-презентирующих клетках, но сопровождается их активацией. Экспрессия антитела к OX40 зависит от полной активации Т-клетки; без CD28, экспрессия антитела к OX40 задерживается и в четыре раза ниже. OX-40 антитела, слитые белки OX-40 и способы их применения раскрыты в патентах США № US 750501; US 7758852; US 7858765; US 7550140; US 7960515; WO 2012/027328; WO 2013/028231.

Дополнительными примерами добавочного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевый агент) для использования в комбинации или для совместного введения с предложенными в настоящем изобретении ингибирующими CD73 соединениями являются антагонисты толл-подобного рецептора 4 (TLR4).

Известно, что аминокилглюкозаминидные фосфаты (AGP) могут быть использованы в качестве адъювантов вакцин и иммуностимулирующих агентов для стимулирования продуцирования цитокинов, активации макрофагов, стимулирования врожденного иммунного ответа и усиления продукции антител у иммунизированных животных. Аминокилглюкозаминидные фосфаты (AGP) являются синтетическими лигандами толл-подобного рецептора 4 (TLR4). AGP и их иммуномодулирующие эффекты посредством TLR4 раскрыты в патентных публикациях, таких как WO 2006/016997, WO 2001/090129 и/или в патенте США № 61131918, и были описаны в литературе. Другие AGP производные описаны в патенте США № 7122919, патенте США № 6525028 и патенте США № 6911434. Некоторые AGP действуют как агонисты TLR4, в то время как другие признаны в качестве антагонистов TLR4.

Дополнительными примерами добавочного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевый агент) для использования в комбинации или для совместного введения с предложенными в настоящем изобретении ингибирующими CD73 соединениями являются антитела к ICOS.

CDR для мышиных антител к человеческому ICOS, обладающие антагонистической активностью, показаны в PCT/EP2012/055735 (WO 2012/131004). Антитела к ICOS описаны также в WO 2008/137915, WO 2010/056804, EP1374902, EP 1374901 и EP 1125585.

Дополнительными примерами добавочного активного ингредиента или ингредиентов (противоопухолевый агент) для использования в комбинации или для совместного введения с предложенным в настоящем изобретении соединением формулы (I) являются соединения, модулирующие STING, ингибиторы CD39 и антагонисты аденозина A2a и A2b.

В одном варианте осуществления способ лечения злокачественных новообразований в соответствии с настоящим изобретением включает совместное введение соединения формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного противоопухолевого агента, такого как выбранного из группы, включающей антимицротрубочковые агенты, платиновые координационные комплексы, алкилирующие агенты, антибиотики, ингибиторы топоизомеразы II, антиметаболиты, ингибиторы топоизомеразы I, гормоны и аналоги гормонов, ингибиторы пути передачи сигналов, ингибиторы ангиогенеза, нерецепторной тирозинкиназы, иммунотерапевтические агенты, проапоптотические агенты, ингибиторы сигнализации клеточного цикла; ингибиторы протеасом; и ингибиторы ракового метаболизма.

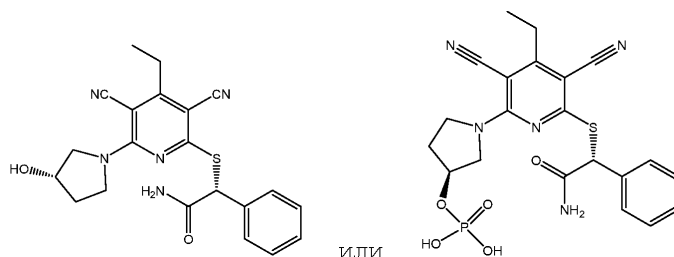
Соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли могут быть введены вместе по меньшей мере с одним другим активным агентом, использование которого известно при лечении бета-гемоглобинопатии, такой как серповидно-клеточное заболевание, серповидно-клеточная анемия, и бета-талассемии.

Примером дополнительного активного ингредиента или ингредиентов для использования в комбинации или для совместного введения с предложенными в настоящем изобретении комбинациями является гидроксимочевина.

Композиции.

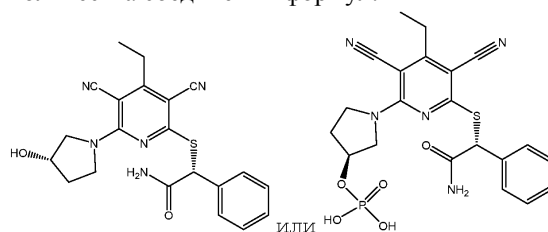
Фармацевтически активные соединения в объеме настоящего изобретения могут быть использованы в качестве селективных ингибиторов DNMT1 у нуждающихся в этом млекопитающих, в частности у людей.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и эффективное количество соединений формул:



или их фармацевтически приемлемой соли.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования, предраковых симптомов и других состояний, требующих ингибирования DNMT1, который включает введение эффективного количества соединений формул:



или их фармацевтически приемлемой соли.

Упомянутые выше соединения также обеспечивают способ лечения указанных выше болезненных состояний ввиду их продемонстрированной способности действовать в качестве ингибиторов DNMT1. Препарат можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, любым обычным способом введения, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенное, внутримышечное, пероральное, местное, подкожное, внутрикожное, внутриглазное и парентеральное.

Фармацевтически активные соединения по настоящему изобретению составлены в удобные лекарственные формы, такие как капсулы, таблетки или инъекционные препараты. Используются твердые или жидкие фармацевтические носители. Твердые носители включают крахмал, лактозу, дигидрат сульфата кальция, каолин, сахарозу, тальк, желатин, агар, пектин, аравийскую камедь, стеарат магния и стеариновую кислоту. Жидкие носители включают сироп, арахисовое масло, оливковое масло, физиологический раствор и воду. Подобным образом, носитель или разбавитель может включать в себя любое вещество с пролонгированным высвобождением, такое как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, отдельно или с воском. Количество твердого носителя варьирует в широких пределах, но, предпочтительно, составляет от примерно 25 мг до примерно 1 г на единицу дозирования. Когда используется жидкий носитель, препарат будет находиться в виде сиропа, эликсира, эмульсии, мягкой желатиновой капсулы, стерильной инъекционной жидкости, например, ампула, или в виде водной или неводной жидкой суспензии.

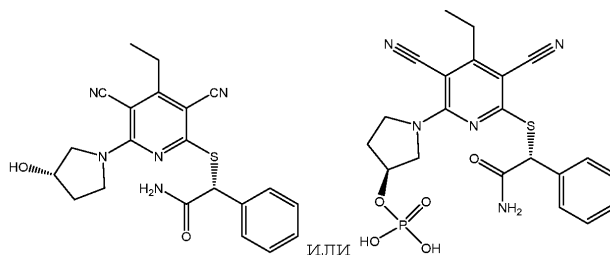
Фармацевтические композиции получают общепринятыми методами фармацевтической химии, включающих смешивание, гранулирование и прессование, когда это необходимо, для формирования таблеток, или смешивание, наполнение и растворение ингредиентов, если это необходимо, для получения желаемых пероральных или парентеральных продуктов.

Дозы предлагаемых в изобретении фармацевтически активных соединений в фармацевтической дозированной единице, как описано выше, представляют собой эффективное, нетоксичное количество, предпочтительно выбранное в диапазоне 0,001-500 мг/кг активного соединения, предпочтительно 0,01-100 мг/кг. При лечении человека, нуждающегося в ингибиторе DNMT1, выбранную дозу вводят, предпочтительно, 1-6 раз в день, перорально или парентерально. Предпочтительные формы парентерального введения включают местное, ректальное, трансдермальное, путем инъекций и непрерывно путем инфузии. Пероральные дозированные единицы для введения человеку предпочтительно содержат от 0,5 до 3500 мг активного соединения. Приемлемые пероральные дозированные единицы для введения человека предпочтительно содержат от 0,5 до 1000 мг активного соединения. Предпочтительным является пероральное введение, при котором используются более низкие дозы. Парентеральное введение в высоких дозах, однако также может использоваться, когда оно безопасно и удобно для пациента.

Специалисты в данной области могут легко определить оптимальные дозировки, и они могут варьироваться в зависимости от конкретного используемого ингибитора DNMT1, эффективности препарата, способа введения и улучшения состояния болезни. Адаптивные факторы в зависимости от конкретного пациента, получающего лечение, включая возраст пациента, вес, питание и времени введения, могут приводить к необходимости корректировки дозировок.

Способ по настоящему изобретению индуцирования ингибирующей активности DNMT1 у млекопитающих, включая людей, включает введение субъекту, нуждающемуся в такой активности, эффективного количества ингибирующего DNMT1 фармацевтически активного соединения по настоящему изобретению.

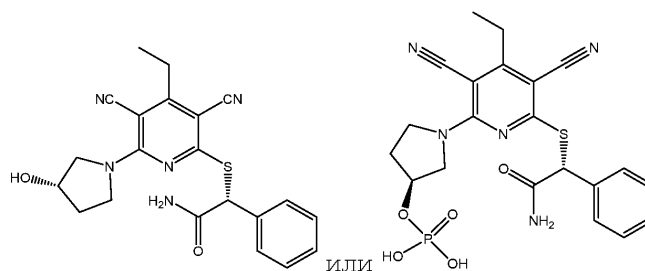
Изобретение относится также к применению соединений формул:



или их фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного средства для применения в качестве ингибитора DNMT1.

Кроме того, фармацевтически активные соединения по настоящему изобретению могут быть введены совместно с дополнительными активными ингредиентами, такими как другие соединения, использование которых для лечения злокачественных новообразований является известным, или соединения, для которых известна успешность при их использовании в комбинации с ингибитором DNMT1.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей от 0,5 до 1000 мг соединений формул:



или их фармацевтически приемлемой соли и от 0,5 до 1000 мг фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества.

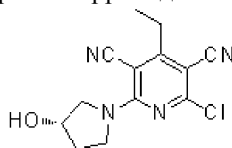
Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области техники может, используя предшествующее описание, использовать настоящее изобретение в полной мере. Поэтому следующие примеры должны быть истолкованы просто как иллюстративные, а не ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Примеры

Следующие далее примеры иллюстрируют данное изобретение. Эти примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, а скорее для предоставления специалисту в данной области техники руководства по получению и применению соединений, композиций и способов по настоящему изобретению. Хотя представлены описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисту в данной области будет понятно, что могут быть сделаны различные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 168.

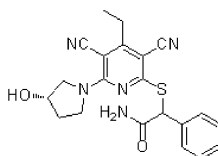
(R)-2-((3,5-Дициано-4-этил-6-((S)-3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-2-ил)тио)-2-фенилацетамид
Стадия 1. (S)-2-Хлор-4-этил-6-(3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-3,5-дикарбонитрил



К раствору 2,6-дихлор-4-этилпиридин-3,5-дикарбонитрила (описан в примере 3, стадия 2, 678 мг, 3,00 ммоль) и (S)-пирролидин-3-ола (261 мг, 3,00 ммоль) в N,N-диметилформамиде (20 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,418 мл, 3,00 ммоль) и образовавшуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь выливали в воду (100 мл) и экстрагировали EtOAc (100 мл×2). Объединенные органические слои сушили и концентрировали с получением (S)-2-хлор-4-этил-6-(3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-3,5-дикарбонитрила (620 мг, 75%-ный выход) в виде твердого вещества бледного цвета.

ЖХМС $m/z=276,9 [M+H]^+$.

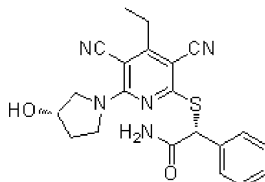
Стадия 2. 2-((3,5-Дициано-4-этил-6-((S)-3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-2-ил)тио)-2-фенилацетамид



Раствор (S)-2-хлор-4-этил-6-(3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-3,5-дикарбонитрила (500 мг, 1,81 ммоль), тиацетата калия (248 мг, 2,17 ммоль) в N,N-диметилформамиде (ДМФ) (15 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем в раствор добавляли 2-амино-2-оксо-1-фенилэтил метансульфонат (синтез описан в примере 3, стадия 5, 497 мг, 2,17 ммоль) и триэтиламин (0,50 мл, 3,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Реакционную смесь выливали в воду (100 мл) и экстрагировали EtOAc (100 мл×2). Объединенные органические слои сушили, концентрировали и очищали на колонке с силикагелем (элюируя смесью MeOH/DCM 0-2%) с получением 2-((3,5-дициано-4-этил-6-((S)-3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-2-ил)тио)-2-фенилацетамида (380 мг, 51%-ный выход) в виде твердого вещества белого цвета.

ЖХМС $m/z=407,9$ $[M+H]^+$.

Стадия 3. (R)-2-((3,5-Дициано-4-этил-6-((S)-3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-2-ил)тио)-2-фенилацетамид



2-((3,5-Дициано-4-этил-6-((S)-3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-2-ил)тио)-2-фенилацетамид (250 мг, 0,62 ммоль) разделяли с помощью хиральной ЖХВД (колонка chiralpak-IC, HEX-EtOH (FA) с получением (R)-2-((3,5-дициано-4-этил-6-((S)-3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-2-ил)тио)-2-фенилацетамида. Абсолютная конфигурация хирального центра рядом с атомом серы была подтверждена с помощью анализа VCD. (30 мг).

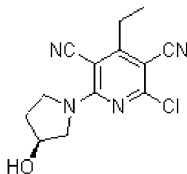
ЖХМС $m/z=408,1$ $[M+H]^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ м. д. 7,91 (шир. с, 1H), 7,52 (шир. с, 1H), 7,52-7,49 (м, 1H), 7,44-7,22 (м, 4H), 5,61 (с, 1H), 5,14 (д, $J=3,4$ Гц, 1H), 4,41 (с, 1H), 4,05-3,65 (м, 4H), 2,74 (кв, $J=7,4$ Гц, 2H), 2,07-1,85 (м, 2H), 1,21 (кв, $J=7,6$ Гц, 3H).

Пример 418.

(S)-1-(6-(((R)-2-Амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил дигидрофосфат.

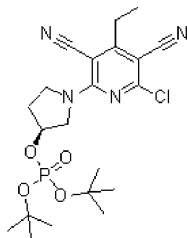
Стадия 1. (S)-2-Хлор-4-этил-6-(3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-3,5-дикарбонитрил



В перемешиваемый раствор (S)-пирролидин-3-ола гидрохлорида (54,7 г, 442 ммоль) в дихлорметане (DCM) (3000 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли ТЕА (154 мл, 1106 ммоль) и 2,6-дихлор-4-этилпиридин-3,5-дикарбонитрил (синтез описан в примере 3, стадия 2, 100 г, 442 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли водой (2000 мл) и экстрагировали DCM (2×2000 мл). Объединенные органические слои промывали водой (2×2000 мл), насыщенным солевым раствором (1000 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого вещества. Сырое вещество растирали в диэтиловом эфире (1000 мл), фильтровали и сушили с получением (S)-2-хлор-4-этил-6-(3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-3,5-дикарбонитрила (110 г, 89%) в виде твердого вещества бледно-коричневого цвета.

ЖХМС $m/z=277,1$ $[M+H]^+$.

Стадия 2. (S)-Ди-трет-бутил (1-(6-хлор-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил)фосфат

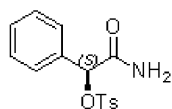


В перемешиваемый раствор (S)-2-хлор-4-этил-6-(3-гидроксипирролидин-1-ил)пиридин-3,5-дикарбонитрила (160 г, 578 ммоль) в тетрагидрофуране (ТГФ) (1500 мл) при комнатной температуре добавляли 1H-тетразол (81 г, 1156 ммоль) и ди-трет-бутил диэтилфосфорамидит (202 г, 809 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученную реакционную

смесь охлаждали до температуры 0°C, затем в реакционную смесь добавляли по каплям 2-гидроперокси-2-метилпропан (145 мл, 867 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным раствором бисульфита натрия (1,5 л) и экстрагировали этилацетатом (3×1,5 л). Объединенные органические слои промывали водой (1,0 л), насыщенным соевым раствором (1,0 л), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого вещества. Сырое вещество очищали путем хроматографии на колонке с нейтральным оксидом алюминия (элюент: 20% EtOAc в гексане) с получением (S)-ди-трет-бутил (1-(6-хлор-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил)фосфата (125 г, 46%) в виде твердого вещества не совсем белого цвета.

ЖХМС m/z=469,2 [M+H]⁺.

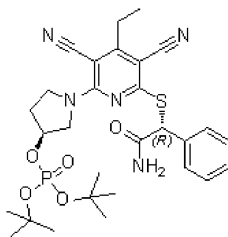
Стадия 3. (S)-2-Амино-2-оксо-1-фенилэтил 4-метилбензолсульфонат



В перемешиваемый раствор (S)-2-гидрокси-2-фенилацетамида (30 г, 198 ммоль) в 1,4-диоксане (300 мл) при комнатной температуре добавляли DIPEA (104 мл, 595 ммоль) и DMAP (2,425 г, 19,85 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до температуры 0°C, затем в реакционную смесь по частям добавляли Ts-Cl (56,8 г, 298 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь выливали в ледяную воду (2000 мл), перемешивали в течение 10 мин, и осаждалось твердое вещество. Выпавший в осадок твердый продукт собирали фильтрованием и сушили с получением сырого соединения. Сырое вещество растирали в диэтиловом эфире (2×500 мл) с получением (S)-2-амино-2-оксо-1-фенилэтил 4-метилбензолсульфоната (38 г, 58%) в виде твердого вещества не совсем белого цвета.

ЖХМС m/z=306,1 [M+H]⁺.

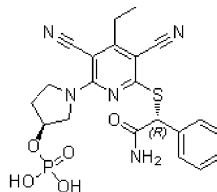
Стадия 4. (S)-1-(6-(((R)-2-Амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил ди-трет-бутил фосфат



В перемешиваемый раствор (S)-ди-трет-бутил (1-(6-хлор-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил)фосфата (40,0 г, 84 ммоль) в N,N-диметилформамиде (ДМФ) (400 мл) при комнатной температуре добавляли тиоацетат калия (14,46 г, 127 ммоль) и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. В реакционную смесь при комнатной температуре добавляли TEA (17,65 мл, 127 ммоль) и (S)-2-амино-2-оксо-1-фенилэтил 4-метилбензолсульфонат (28,1 г, 84 ммоль) и перемешивали в течение 18 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой (2000 мл) и экстрагировали EtOAc (3×1500 мл). Объединенные органические слои промывали ледяной водой (3×2000 мл), насыщенным соевым раствором (1000 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого вещества. Сырое вещество растирали в диэтиловом эфире (200 мл) и н-пентане (1000 мл), фильтровали и сушили с получением твердого вещества бледно-коричневого цвета. Твердый продукт растворяли в EtOAc (500 мл) и фильтровали через Celite®. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением (S)-1-(6-(((R)-2-амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил ди-трет-бутил фосфата (38,0 г, 59%) в виде твердого вещества бледно-коричневого цвета.

ЖХМС m/z=600,3 [M+H]⁺.

Стадия 5. (S)-1-(6-(((R)-2-Амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил дигидрофосфат

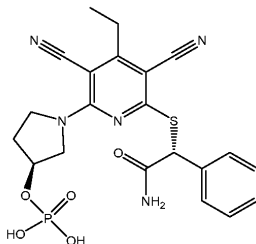


В перемешиваемый раствор (S)-1-(6-(((R)-2-амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил ди-трет-бутил фосфата (38,0 г, 50,2 ммоль) в этаноле (400 мл) и диэтиловом эфире (800 мл) в диэтиловом эфире при температуре 0°C добавляли 2,0 М соляную кислоту

(400 мл, 800 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением сырого вещества. Сырое вещество перегоняли совместно с EtOH (400 мл) и диэтиловым эфиром (800 мл) (3 раза) и сушили с получением твердого вещества бледно-коричневого цвета. Твердый продукт растирали в EtOH (400 мл) и диэтиловом эфире (800 мл), фильтровали и сушили с получением (S)-1-(6-(((R)-2-амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил дигидрофосфата (18,5 г, 75%) в виде твердого вещества не совсем белого цвета.

ЖХМС (m/z): 488,0 [M+H]⁺.

Стадия 6. (S)-1-(6-(((R)-2-Амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил дигидрофосфат



Две партии (S)-1-(6-(((R)-2-амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил дигидрофосфата (4,7 г и 18,5 г) объединяли и растворяли в этаноле (4,0 л). Раствор упаривали при пониженном давлении с получением твердого вещества не совсем белого цвета. Твердый продукт растирали в смеси EtOH и диэтиловым эфиром (200 мл:1000 мл), фильтровали и сушили с получением не совсем белого цвета твердого вещества. Твердый продукт тщательно измельчали пестиком в ступке с получением (S)-1-(6-(((R)-2-амино-2-оксо-1-фенилэтил)тио)-3,5-дициано-4-этилпиридин-2-ил)пирролидин-3-ил дигидрофосфата (22,5 г, 98%) в виде твердого вещества не совсем белого цвета.

ЖХМС (m/z)=488,0 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,88 (с, 1H), 7,52-7,48 (м, 2H), 7,40-7,23 (м, 4H), 5,59 (с, 1H), 4,92 (с, 1H), 4,05-3,96 (м, 2H), 3,95-3,82 (м, 2H), 2,73 (кв, J=7,5 Гц, 2H), 2,24-2,06 (м, 2H), 1,19 (т, J=7,6 Гц, 3H).

Два фосфатных протона не наблюдаются.

Пример 700. Анализ DNMT1 in vitro.

Соединения по изобретению были проанализированы на селективную в отношении DNMT1 активность в одном или нескольких следующих анализах DNMT1, а также могут быть проанализированы в одном или нескольких следующих анализах DNMT3.

Анализ Breaklight DNMT1.

Анализы breaklight DNMT1 in vitro проводили в общем объеме 50 мкл в стандартном формате 384 лунок с использованием черных микропланшетов с несвязывающей поверхностью (Corning 3575). 5 мкл полноразмерной DNMT1 человека (продуцированной изнутри), используемой при конечной концентрации 40 нМ, добавляли к 5 мкл субстратной смеси, содержащей конечные концентрации 125 нМ гемиметилированного олигонуклеотида (синтезированного в ATD Bio; 5'-FAM-ATCTAGCG5ATCAGTTTTCTGATG5G5TAGAT-3', где 5 = метилдезоксцитидин) и 2 мкМ сверхчистого SAM (Cisbio #62SAHZLD). Для отрицательных контрольных лунок использовали 5 мкл DNMT1 и 5 мкл олигонуклеотида, но 0 мкМ SAM. Все реагенты были смешаны в 1× аналитическом буфере (20 мМ Tris pH 6,8, 25 мМ NaCl, 0,5 мМ MgCl₂, 0,01% Triton X100 и 1 мМ DTT). Реакцию инкубировали при 26°C в течение 45 мин и затем останавливали, добавляя 40 мкл проявляющего реагента. Проявляющий реагент, находящийся в 1× Gla-аналитическом буфере (20 мМ Tris pH 8,0, 80 мМ NaCl, 0,75 мМ MgCl₂, 0,01% Triton X100 и 1 мМ DTT), имеет конечную концентрацию 100 мкМ SAH (Sigma #A9384) и 0,0008 единиц/мкл рестрикционной эндонуклеазы Gla1 (Sibenzyme #E494). После добавления проявляющего реагента планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 ч. Интенсивность флуоресценции затем измеряли PHERAstar FS (BMG Labtech) при Ex 485 нм и Em 520 нм с коэффициентом усиления 400 и временем интегрирования 100 мс.

Счетный скрининг-анализ breaklight Gla1

Счетный скрининг-анализ breaklight Gla1 in vitro проводили в общем объеме 50 мкл в стандартном формате 384 лунок с использованием черных микропланшетов с несвязывающей поверхностью (Corning 3575). В тест-луночки помещали по десять мкл субстратной смеси, содержащей конечные концентрации 100 нМ гемиметилированного олигонуклеотида (синтезированного в ATD Bio; 5'-FAM-ATCTAGCG5ATCAGTTTTCTGATG5G5TAGAT-3', где 5 = метилдезоксцитидиновая последовательность) и 25 нМ полностью метилированного олигонуклеотида (синтезированный в ATD Bio; 5'-FAM-ATCTAG5G5ATCAGTTTTCTGATG5G5TAGAT-3', где 5 = метилдезоксцитидин). В отрицательных контрольных лунках использовали 10 мкл 125 нМ гемиметилированного олигонуклеотида. Все реагенты смешивали в 1× аналитическом буфере (20 мМ Tris pH 6,8, 25 мМ NaCl, 0,5 мМ MgCl₂, 0,01% Triton X100 и 1 мМ DTT). Сразу же добавляли 40 мкл проявляющего Gla1 реагента, находящегося в 1× Gla аналити-

ческом буфере (20 mM Tris pH 8,0, 80 mM NaCl, 0,75 mM, MgCl₂, 0,01% Triton X100 и 1 mM DTT) с конечной концентрацией 100 мкМ SAH (Sigma #A9384) и 0,0008 единиц/мкл рестрикционной эндонуклеазы Gla1 (Sibenzyme #E494). После добавления проявляющего реагента планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 ч. Интенсивность флуоресценции затем измеряли на PHERAstar FS (BMG Labtech) при Ex 485 нм и Em 520 нм с коэффициентом усиления 400 и временем интегрирования 100 мс.

Анализ breaklight DNMT3a/3l.

Анализы breaklight DNMT3a/3l *in vitro* проводили в общем объеме 50 мкл в стандартном формате 384 лунок с использованием черных микропланшетов с несвязывающей поверхностью (Corning #3575). 5 мкл полноразмерной DNMT3a/3l человека (продуцированной изнутри), используемой при конечной концентрации 600 нМ, добавляли к 5 мкл субстратной смеси, содержащей конечные концентрации 125 нМ гемиметилированного олигонуклеотида (синтезированного в ATD Bio; 5'-FAM-ATCTAGCG5ATCAGTTTTCTGATG5G5TAGAT-3', где 5 = метилдезоксцитидин) и 2 мкМ сверхчистого SAM (Cisbio #62SAHZLD). В отрицательных контрольных лунках использовали 5 мкл DNMT3a/3l и 5 мкл олигонуклеотида, но также включали 200 мкМ SAH. Все реагенты смешивали в 1× аналитическом буфере (20 mM Tris, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1,5 mM ЭДТА, 0,1 mM MgCl₂, 1 mM CHAPS и 1 mM DTT). Реакцию инкубировали при 37°C в течение 90 мин и затем останавливали, добавляя 40 мкл проявляющего реагента. Проявляющий реагент, находящийся в 1× Gla-аналитическом буфере (20 mM Tris pH 8,0, 80 mM NaCl, 0,75 mM MgCl₂, 0,01% Triton X100 и 1 mM DTT), имел конечную концентрацию 200 мкМ SAH (Sigma #A9384) и 0,0008 единиц/мкл рестрикционной эндонуклеазы Gla1 (Sibenzyme #E494). После добавления проявляющего реагента планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 ч. Интенсивность флуоресценции затем измеряли на PHERAstar FS (BMG Labtech) при Ex 485 нм и Em 520 нм с коэффициентом усиления 400 и временем интегрирования 100 мс.

Методы анализа DNMT1 SPA.

Биохимическую активность DNMT1 анализировали с использованием SPA-технологии. На планшеты (Griener 784075) предварительно наносили 100 нл/лунку соединения (11-точечное, 3-кратное серийное разведение). Реакцию инициировали добавлением 5 мкл 2× ферментной смеси в лунки, содержащие 5 мкл 2× субстратной смеси. Лунки нижнего контроля содержали вместо фермента 5 мкл буфера. После 40-минутной инкубации реакцию гасили добавлением 10 мкл стоп-смеси, содержащей 1 mM SAM (Sigma A7007) и 2 мг/мл PEI-гранул (Perkin Elmer RPNQ0098). Планшеты герметизировали, центрифугировали в течение 1 мин, а затем считывали на Viewlux (Perkin Elmer), используя 613 нм эмиссионный фильтр/300 с время считывания после ≥30-минутной адаптации в темноте. Условия анализа до гашения состояли из 40 нМ DNMT1 (601-1600, продуцированной изнутри), 100 нМ 3H-SAM (American Radiolabeled Chemicals ART 0288), 900 нМ SAM (New England BioLabs B9003S) и 200 нМ гемиметилированного ДНК-олигонуклеотида (синтезированного по технологиям интегрированной ДНК, 5'-CCTCTTCTAACTGCCAT5GATCCTGATAGCAGGTGCATGC-3') в 50 mM HEPES (pH 8,0), 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,01% NP-40 и 0,01% BSA.

Пример 701. Действие на эритроидные клетки- предшественники (EPC) - *in vitro*.

7-дневные EPC культивировали в планшетах с повторами с серийным разведением соединения А (2-([3,5-дициано-6-(диметиламино)-4-этилпиридин-2-ил]сульфанил)-2-фенилацетамид) в течение 5 дней при 37°C. Затем лунки анализировали на индукцию фетального гемоглобина (HbF, HbF ELISA) или рост клеток (Cell Titer-Glo). В обоих случаях сигнал был нормализован относительно клеток, обработанных контрольной несущей средой. Соединение А индуцировало увеличение HbF со средним pEC₅₀=6,5 и ингибировало рост клеток на 50% при среднем pGI₅₀=5,9. Характерные кривые для каждого анализа показаны на фиг. 1А.

Для анализа влияния соединения А на ДНК-метилирование были собраны EPC, обработанные в течение 3 дней соединением А, и геномная ДНК была секвенирована с бисульфитом. Было выбрано метилирование девяти сайтов CpG в участках или вблизи промоторных регионов локусов генов HBG1 и HBG2 и проанализировано на основании их предыдущей характеристики в качестве сайтов метилирования DNMT1 в процессе эритропоэза (Mabaera et al., Blood: 110(4). 2007). Как показано на фиг. 1В, на всех девяти сайтах наблюдалось снижение метилирования в среднем на 65±5% по сравнению с клетками, обработанными несущей средой.

Способы.

Культура, распространение и характеристика эритроидных клеток-предшественников (EPC) на день 7.

Все доноры давали письменное информированное добровольное согласие на использование своих образцов, а также сбор и использование образцов, получивших официальное одобрение экспертного совета организации. Все криоконсервированные клетки CD34+ костного мозга человека, используемые в настоящем документе, были получены от компании AllCells (Emeryville, CA) и, как правило, от разных доноров. Клетки CD34+ культивировали для получения EPC на 7-й день. Вкратце, 1 млн клеток культивировали в 5% CO₂, 5% O₂ при 37°C в среде H3000 Stemspan (StemCell Technologies Vancouver, BC,

Canada), дополненной 2 мМ L-глутамина, 40 мкг/мл липопротеинов человека низкой плотности (StemCell Technologies), 10 нг/мл рекомбинантного человеческого (rh) интерлейкина IL-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 100 нг/мл фактора rh стволовых клеток (R&D Systems) и 0,5 Ед/мл rh эритропоэтина (Invitrogen, Grand Island, NY). Клетки разделяли и поддерживали на 4-й день полной культуральной средой, описанной выше, и собирали на 7-й день для оценки экспрессии эритроидного маркера и оценки индукции γ -глобина. 7 дневные ЕРС затем замораживали в жидком азоте при от 5 до 10 млн клеток/мл в 95% фетальной бычьей сыворотке (FBS, Invitrogen) с 5% ДМСО для последующего использования.

В процессе обработки соединением замороженные 7 дневные ЕРС, полученные, как описано выше, оттаивали, промывали один раз и снова суспендировали в полной культуральной среде, как описано выше, за исключением увеличения rhEPO до 3 Ед/мл. Клетки подсчитывали и разводили до $3,3 \times 10^3$ клеток/мл для нанесения на аналитические планшеты. Затем в 384-луночные планшеты для культивирования клеток, в которые были предварительно дозированы исследуемые соединения при 100 нкл/лунку, с помощью диспенсера Multidrop™ Combi Reagent (Thermo Scientific) распределяли клетки по 30 мкл/лунку. Для анализов ELISA и Cell Titer-Glo использовали черные с прозрачным дном (Greiner Bio-One, 781090) и белые (Greiner Bio-One; 781080) планшеты соответственно. Конечная плотность клеток в анализах составляла 1000 клеток на лунку с конечными концентрациями соединений между 33 нМ (самая высокая) и 6,6 нМ (самая низкая) для 22-точечного серийного разведения.

Для наблюдения за здоровьем клеток и ростом клеток анализы роста клеток проводили в процессе посева клеток (день 0) с использованием Cell Titer-Glo (подробно описано ниже). Для обработки соединением планшеты для культивирования клеток инкубировали в течение 5 дней при температуре 37°C с 5% CO₂.

Фетальный гемоглобин (HbF) ELISA.

Покрытие анти-HbF Ab (Bethyl Lab; cat. A80-136A) 100-кратно разводили в буфере для покрытия (0,05 М карбоната-бикарбоната, pH 9,6), а затем добавляли по 20 мкл/лунку на 384-луночный планшет MaxiSorp ELISA (Thermo Fisher, cat. 464718). После 1 ч инкубации при комнатной температуре планшеты дважды промывали промывочным буфером ELISA (50 мМ Tris, 0,05% Tween 20, pH 8,0) с помощью машины для мойки планшетов EL406 (BioTek, Winooski, VT). Затем на планшет добавляли 40 мкл/лунку блокирующего буфера, состоящего из 50 мМ Tris и 1% BSA (pH 8,0), и хранили при 4°C с покрывающим слоем в течение ночи или до времени анализа. Покрытые планшеты ELISA были стабильными в течение 30 дней при 4°C. В день анализа перед добавлением клеточного лизата планшеты дважды промывали промывочным буфером ELISA.

После выдерживания 5 дней при температуре 37°C с 5% CO₂ планшеты для культуры клеток для анализа ELISA помещали в морозильник при температуре -80°C на 2 ч как минимум. После оттаивания при комнатной температуре 30 мкл буфера для лизиса клеток (Invitrogen; cat. FNN0011, дополненного 1× ингибитором протеазы) добавляли в каждую лунку, и полученный клеточный лизат смешивали восемь раз с помощью пипетки Cybi-Well (Jena, Germany). После процедуры смешивания по 20 мкл/лунку лизата переносили на покрытые планшеты ELISA, описанные выше, после чего 1 ч инкубировали при комнатной температуре. Планшеты для анализа ELISA три раза промывали промывочным буфером ELISA. Затем добавляли 20 мкл на лунку от 1:75000 до 100000 разведенного конъюгата пероксидазы хрена (HRP) анти-HbF Ab (Bethyl Labs; cat. A80-136P, разведенного в 50 мМ Tris [pH 8,0], 1% BSA, 0,05% Tween-20). Спустя еще 1 ч инкубации при комнатной температуре планшеты промывали четыре раза, а затем добавляли 20 мкл/лунку тетраметилбензидинового субстрата ELISA (Thermo Scientific; cat. 34028). После инкубации в течение 3-10 мин при комнатной температуре в темноте добавляли 20 мкл/лунку стоп-раствора (0,2 М серную кислоту). Затем планшеты считывали при поглощении 450 нм (OD450) с помощью планшетного ридера Envision (PerkinElmer, Waltham, MA). Среднее показание контрольных лунок (16 лунок в колонке 6 каждого аналитического планшета), содержащих только ДМСО, использовалось в качестве базального уровня для нормализации. Уровень γ -глобина для каждой обработанной лунки был рассчитан как процент от базального уровня (100%).

Нормализованные ответы 22 концентраций каждого исследуемого соединения подвергали подгонке кривой с использованием специализированного статистического вычислительного инструмента на основе R (R основа для статистических вычислений). Значение EC₅₀ (концентрация соединения при 1/2 Max%) и соответствующий Max% определяли по установленной кривой каждого активного соединения.

Анализ роста клеток 7-дневных ЕРС.

Анализ роста клеток проводили на планшетах для культивирования клеток после 5-дневной инкубации при температуре 37°C с 5% CO₂. К аналитическим планшетам добавляли 15 мкл/лунку реагента для анализа Cell Titer-Glo (Promega, Madison, WI). Планшеты затем инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем считывали на ViewLux 1430 (Perkin Elmer) с использованием протокола люминесценции. Среднее показание контрольных лунок (16 лунок в колонке 6 каждого аналитического планшета), содержащих только ДМСО, использовали в качестве базального уровня для нормализации. Сигнал Cell Titer-Glo каждой тестовой лунки рассчитывали как процент от базального уровня (100%). Нормализованные ответы 22 концентраций каждого исследуемого соединения подвергали подгонке кри-

вой с использованием специализированного статистического вычислительного инструмента на основе R (R основа для статистических вычислений).

Для контроля за здоровьем клеток и роста клеток сигнал Cell Titer-Glo контрольных лунок ДМСО сравнивали с сигналом, полученным в день 0 (см. выше). Для здорового роста клеток приблизительно 20-кратное увеличение обычно наблюдалось на 5-й день относительно дня 0.

Бисульфитный анализ последовательностей.

Геномную ДНК экстрагировали в двух повторностях из 7 дневных ЕРС, культивировали при 37°C с 5% CO₂ и 5% O₂ в течение 3 дней в присутствии соединения с использованием набора ZYMO gDNA (Zymo Research, Irvine, CA). Выделенную ДНК подвергали бисульфитному преобразованию, используя набор ДНК-метилирования Zymo EZ. Наборы праймеров для областей, обработанных бисульфитом в HBG1 и HBG2, были разработаны с использованием программного обеспечения ABI Methyl Primer Express. Анализируемые области включали 9 ранее описанных сайтов DNMT1-зависимого ДНК-метилирования (Mabaeta et al. Blood: 110 (4). 2007). ДНК далее амплифицировали технологией fluidigm и QC'd с использованием биоанализатора Agilent. MiSeq был выполнен с использованием системы Illumina, и результат был проанализирован с использованием ArrayStudio v8 и CLC-GWB v8.1.

Пример 702. Антипролиферативная активность MV-4-11 (категория pEC₅₀).

Анализ клеточной пролиферации. Оптимальную плотность посева клеток определяли эмпирически для клеток AML MV-4-11 путем изучения роста широкого спектра плотностей посева в формате 384 лунок для определения условий, которые предполагали максимально допустимую и продолжительную пролиферацию в течение 6 дней. Клетки MV-4-11 высевали в двух повторностях на планшеты за 24 ч до обработки с помощью 20-точечной двукратной серии разведения соединения или 0,15% ДМСО. Планшеты инкубировали в течение 6 дней при температуре 37°C в 5% CO₂. Затем клетки лизировали с помощью CellTiter-Glo (CTG) (Promega), и хемилюминесцентный сигнал детектировали с помощью соответствующего считывающего устройства для микропланшетов. Кроме того, для количественной оценки исходной плотности клеток во время добавления соединения (T₀) собирали необработанный планшет с клетками. Значения CTG, полученные после 6 дней обработки, выражали в процентах от значения T₀ и выстраивали график относительно концентрации соединения. Данные были сопоставлены с четырехпараметрическим уравнением для построения кривой зависимости от концентрации, по которой рассчитывались значения IC₅₀ роста.

Пример 703. Серповидно-клеточный анализ *in vivo*.

Для определения *in vivo* эффективности соединения А, показанного ранее как обладающее сильной активностью *in vitro* в отношении первичных эритроидных клеток-предшественников человека, полученных из нормального костного мозга, или мононуклеарных клеток периферической крови пациента с серповидными клетками, была использована мышьяная модель серповидно-клеточной анемии.

Способы.

Подготовка эксперимента.

Активность *in vivo* соединения А изучали на мышьяной модели с серповидными клетками в соответствии со стандартами US/UK по уходу за животными.

Самцы и самки мышей, трансгенные по гемоглобину человека [B6; 129-Nbatm1(HBA)Tow/Hbbtm2(HBG1,HBV*)Tow/J Mice (Jackson Laboratories, ME)], в начале исследований были возраста примерно 6-8 недель и весили приблизительно 15-25 г. Насколько это возможно, группы были сбалансированы по половому признаку и состояли из 6 мышей.

Описание опыта.

Мышам вводили несущую среду (10% DMA/90% PEG400), 10 или 50 мг/кг соединения А два раза в день (BID) пероральным путем пять дней в неделю в течение двух недель.

В конце периода дозирования мышей подвергали эвтаназии асфиксией CO₂, и кровь из поллой вены собирали в пробирки EDTA для анализа фетального гемоглобина. % HbF белка определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и % F клеток (экспрессирующих HbF эритроциты) определяли с помощью проточной цитометрии. Для идентификации HbF-экспрессирующих эритроидных клеток использовали мышьяное моноклональное антитело против HbF человека, конъюгированное с APC (Life Technologies, Grand Island, NY). Для отделения популяций ретикулоцитов и RBC использовали ядерный краситель syto16 (Life Technologies). Данные по белку и клеткам собирали на анализаторе Bio-Rad D10 (Bio-Rad, Benicia, CA) и FACs Canto I (BD BioSciences, San Jose, CA), соответственно. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного обеспечения Flowjo v7 (Treestar, Inc Ashland, OR). Среднее значение и стандартное отклонение были определены для групп контроля и обработки. Данные были сведены в диаграммы и проанализированы с использованием однонаправленного ANOVA с пост-тестом Tukey (Graphpad Prism v5 [La Jolla, CA]).

Результаты.

Соединение А, вводимое перорально в дозе 10 или 50 мг/кг, BID ежедневно (5 дней дозирования, 2 дня отдыха, 4 дня дозирования) вызывало увеличение % HbF белка, который был зависимым от дозы и статистически значимым (5,4 раза, p<0,05; 10,3 раза, p<0,001 соответственно) [фиг. 2A].

Обработка соединением А вызывала увеличение % F ретикулоцитов и % F RBC после перорального

введения 10 или 50 мг/кг BID в течение 2-недельного дозирования. Наблюдалось дозозависимое и статистически значимое увеличение % F ретикулоцитов (4-кратное и 9-кратное, соответственно; $p < 0,001$) и % F RBC (6-кратное и 8-кратное соответственно; $p < 0,001$) [фиг. 2B].

Биологическая активность.

Специалистам в данной области понятно, что вышеуказанные анализы могут подвергаться изменчивости от эксперимента к эксперименту. Соответственно, следует понимать, что значения ниже приведены только в качестве примеров.

Соединения по изобретению были исследованы на активность против DNMT1, как правило, в соответствии с вышеуказанным анализом breaklight и/или анализом SPA.

Таблица данных DNMT1.

Категория биннинга (pXC_{50}):

Категория A: $< 4,5$.

Категория B: $4,5 \leq x < 6,0$.

Категория C: $6,0 \leq x < 6,5$.

Категория D: $\geq 6,5$.

Пример#	DNMT1 BioChemical (величина pEC_{50})	ЕРС ELISA (величина pEC_{50})	MV4-11 Антипролиферативная активность (величина EC_{50})	DNMT3A Breaklight IC_{50} (микромольная)	DNMT3B Breaklight IC_{50} (микромольная)
168	D	C			
418	B	A			

Комментарии.

1. Соединения показывают указанный уровень активности как в анализе breaklight, так и в анализе SPA, описанных выше.

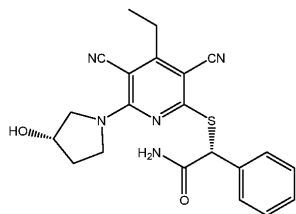
2. Если поле является пустым, то в этом анализе соединение не тестировалось.

Соединение по примеру 168 было протестировано в основном в соответствии с приведенным выше анализом DNMT1 breaklight и/или анализом SPA и в повторных экспериментальных прогонах показывали среднее значение $pIC_{50} > 6,5$.

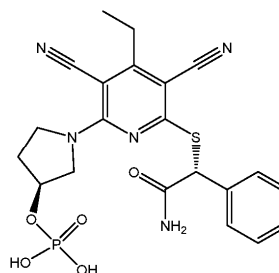
Хотя предпочтительные варианты осуществления изобретения проиллюстрированы вышеизложенным, следует понимать, что изобретение не ограничено предписываемыми здесь инструкциями и что право на все изменения, входящие в объем следующей формулы изобретения, защищено.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединения, представленные следующими формулами:

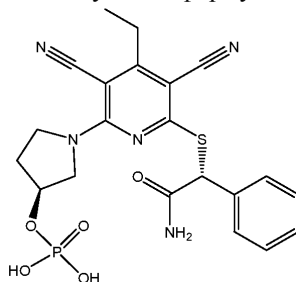


ИЛИ



или их фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, представленное следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

4. Способ лечения заболевания, выбранного из злокачественного новообразования, предраковых состояний, бета-гемоглинопатий, серповидно-клеточного заболевания, у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения, описанного в любом из пп.1, 2, или его фармацевтически приемлемой соли.

5. Способ по п.4, в котором заболевание представляет собой серповидно-клеточную анемию.

6. Способ по п.4, в котором заболевание представляет собой бета-талассемию.

7. Способ по пп.4-6, где млекопитающим является человек.

8. Способ по п.4, где указанное злокачественное новообразование выбрано из следующих: опухоль мозга (глиома), глиобластома, астроцитомы, мультиформная глиобластома, синдром Баньяна-Зонана, болезнь Коудена, болезнь Лермитта-Дюкло, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак почек, рак легких, рак печени, меланома, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарцинома, протоковая аденокарцинома, аденосквамозная карцинома, ацинарно-клеточный рак, глюкоганома, инсулинома, рак предстательной железы, саркома и рак щитовидной железы.

9. Способ по п.4, где указанное злокачественное новообразование выбрано из следующих: рак груди, воспалительный рак груди, дуктальная карцинома, лобулярная карцинома, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, инсулинома, аденокарцинома, протоковая аденокарцинома, аденосквамозная карцинома, ацинарно-клеточный рак, глюкоганома, рак кожи, меланома, метастатическая меланома, рак легких, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточная карцинома, крупноклеточная карцинома, опухоль мозга (глиома), глиобластома, астроцитомы, мультиформная глиобластома, синдром Баньяна-Зонана, болезнь Коудена, болезнь Лермитта-Дюкло, опухоль Вильмса, саркома Юинга, рабдомиосаркома, эпендимомы, медуллобластома, рак головы и шеи, рак почек, рак печени, меланома, рак яичников, рак предстательной железы, саркома, остеосаркома, гигантоклеточная опухоль кости, рак щитовидной железы, лимфобластный Т-клеточный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический нейтрофильный лейкоз, острый лимфобластный Т-клеточный лейкоз, плазмацитома, иммунобластный крупноклеточный лейкоз, лейкоз мантийных клеток, множественная миелома, мегакариобластный лейкоз, острый мегакариоцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, эритролейкоз, злокачественная лимфома, лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы, Т-клеточная лимфобластная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, нейробластома, рак мочевого пузыря, рак вульвы, рак шейки матки, рак эндометрия, мезотелиома, рак пищевода, рак слюнных желез, печеночноклеточный рак, рак желудка, рак носоглотки, рак щеки, рак полости рта, GIST (гастроинтестинальная стромальная опухоль), нейроэндокринные раковые образования и рак яичка.

10. Способ по п.9, где млекопитающим является человек.

11. Способ по п.4, где указанное предраковое состояние выбрано из интраэпителиальной цервикальной неоплазии, моноклональной гаммапатии неустановленной этиологии (MGUS), миелодиспластического синдрома, апластической анемии, болезни шейки матки, невусов кожи (предмеланома), протастической интраэпителиальной (интрадуктальной) неоплазии (PIN), дуктальной карциномы in situ (DCIS), полипов толстой кишки и тяжелой формы гепатита или цирроза.

12. Применение соединения, описанного в любом из пп.1 или 2, или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного средства для лечения или уменьшения тяжести злокачественного новообразования.

13. Способ ингибирования активности DNMT1 (ДНК-метилтрансферазы) у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения, описанного в любом из пп.1, 2, или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Способ по п.13, где млекопитающим является человек.

15. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества:

a) соединения, описанного в любом из пп.1, 2, или его фармацевтически приемлемой соли;

b) по меньшей мере одного противоопухолевого агента.

16. Способ по п.15, где по меньшей мере один противоопухолевый агент выбран из группы, включающей антимицротрубчатые агенты, платиновые координационные комплексы, алкилирующие агенты, антибиотики, ингибиторы топоизомеразы II, антимаетаболиты, ингибиторы топоизомеразы I, гормоны и аналоги гормонов, ингибиторы пути передачи сигналов, ингибиторы ангиогенеза, рецепторной тирозинкиназы, иммунотерапевтические агенты, проапоптотические агенты, ингибиторы сигнализации клеточного цикла, ингибиторы протеасом, ингибиторы ракового метаболизма, анти-PD-L1 агенты, антагонист PD-1, иммуномодуляторы, соединения, модулирующие STING, ингибиторы CD39, антагонисты аденозина A2a, антагонисты TLR4, антитела к ICOS и антитела к OX40.

17. Фармацевтическая комбинация, содержащая:

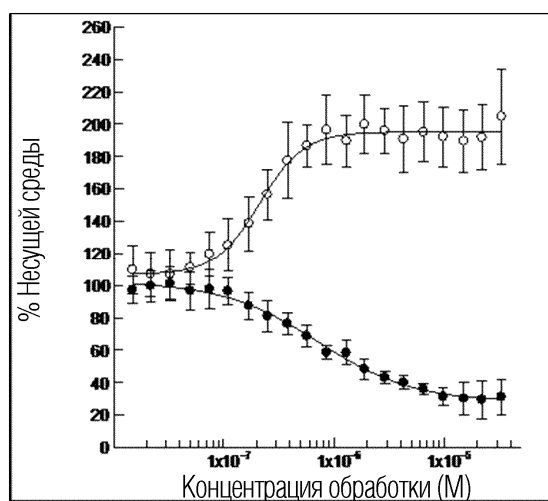
a) соединение, описанное в любом из пп.1, 2, или его фармацевтически приемлемую соль;

b) по меньшей мере один противоопухолевый агент.

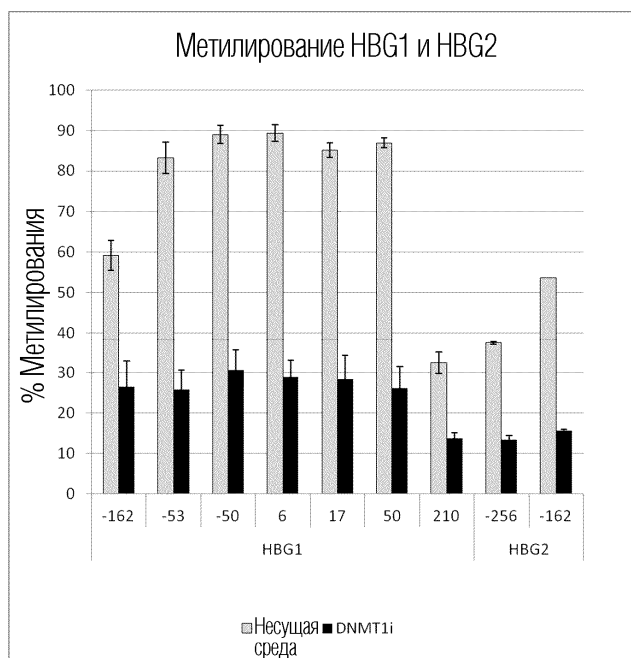
18. Фармацевтическая комбинация по п.17 для лечения злокачественного новообразования.

19. Фармацевтическая комбинация, содержащая:

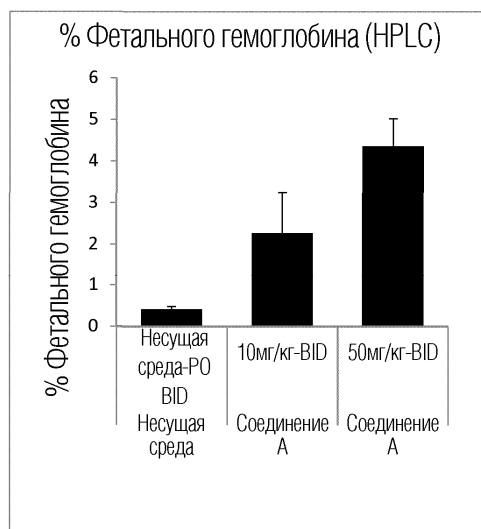
- а) соединение, описанное в любом из пп.1, 2, или его фармацевтически приемлемую соль;
 б) по меньшей мере один агент, используемый для лечения бета-гемоглинопатий.
20. Фармацевтическая комбинация по п.19 для лечения серповидно-клеточного заболевания.
 21. Фармацевтическая комбинация по п.19 для лечения бета-талассемии.
 22. Способ лечения заболевания, выбранного из диабетической нефропатии, диабета, повреждения подоцитов, атеросклероза, псориаза, идиопатического легочного фиброза, склеродермии, цирроза печени, ревматоидного артрита и болезни Альцгеймера, у нуждающегося в этом млекопитающего, который включает введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения, описанного в любом из пп.1, 2, или его фармацевтически приемлемой соли.
 23. Способ по п.22, где млекопитающим является человек.
 24. Фармацевтическая композиция, содержащая от 0,5 до 1000 мг соединения или его фармацевтически приемлемой соли, определенных в любом из пп.1 или 2, и от 0,5 до 1000 мг фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества.



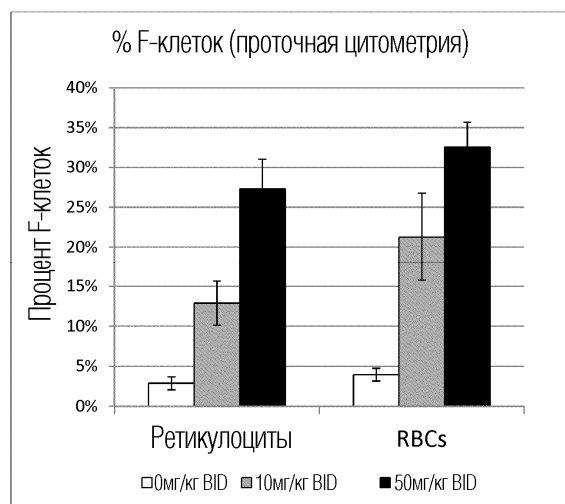
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2А



Фиг. 2В

