

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041464**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.26

(21) Номер заявки
201992528

(22) Дата подачи заявки
2018.04.19

(51) Int. Cl. *A61K 31/4192* (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРИ ПОМОЩИ ТРИЗАМЕЩЕННОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗОТРИАЗОЛА

(31) 15/494,820; 15/899,707

(32) 2017.04.24; 2018.02.20

(33) US

(43) 2020.02.28

(86) PCT/IB2018/052710

(87) WO 2018/197997 2018.11.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОРИДЖИН ДИСКАВЕРИ
ТЕКНОЛОДЖИЗ ЛИМИТЕД (IN)**

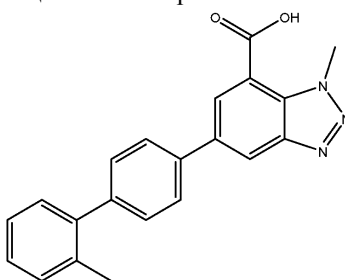
(72) Изобретатель:
**Неллоре Кавита, Хосахалли
Субраманиа (IN)**

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

(56) WO-A2-2014128669

VYAS V.K. ET AL.: "Recent Developments in the Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH) Inhibitors", MINI REVIEWS IN MEDICINAL CHEM, BENTHAM SCIENCE PUBL, NL, vol. 11, no. 12, 1 October 2011 (2011-10-01), pages 1039-1055, XP009185054, ISSN: 1389-5575, DOI: 10.2174/138955711797247707, abstract

(57) В изобретении представлен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту соединения формулы или его фармацевтически приемлемой соли.

**B1****041464****041464****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на настоящий патент испрашивает приоритет заявки на патент США № 15/899707, поданной 20 февраля 2018 г., заявки на патент США № 15/494820, поданной 24 апреля 2017 г., и патента США № 9937155, обе из которых включены сюда посредством ссылки во всей полноте.

Область техники

Изобретение относится к новым тризамещенным производным бензотриазола формулы (I), которые являются ингибиторами дигидрооротатдегидрогеназы. В частности, изобретение относится к новым соединениям, которые ингибируют активность фермента ДГОДГ, к способу их производства и фармацевтическим композициям, содержащим их, и к их применению для лечения и профилактики заболеваний или расстройств, в частности их применению в заболеваниях или расстройствах, при которых преимущественно ингибировать ДГОДГ.

Описание уровня техники

ДГОДГ является белком, который катализирует одну из стадий нового биосинтетического пути пиримидинового нуклеотида (Greene et al. *Biochem Pharmacol* 1995, 50:861-7; Davis J.P et al. *FASEB J* 1996, 10(6): Abst C23). Он катализирует только реакцию окисления/восстановления в этом пути, которая является стадией превращения ДГО (дигидрооротата) в оротат с помощью флавинового кофактора и электронного акцептора. Было обнаружено, что ингибиторы дигидрооротатдегидрогеназы имеют более широкое применение в качестве химиотерапевтических агентов. (Kensler et al. 1989 in: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*; Sandier, M., and Smith, H. J. Eds., p. 379-401 Oxford Univ Press, Oxford England; Cody et al. *Am. J. Clin. Oncol.* 16, 526-528 (1993)).

В качестве примера ингибиторов ДГОДГ, производное хинолина Бреквинар (6-фтор-2-(2'-фтор[1,1'-бифенил]-4-ил)-3-метил-4-хинолинкарбоновая кислота) демонстрирует противораковую активность в отношении L1210 мышинного лейкоза (Andreson L.W. et al. *Cancer Commun.* 1989; 1(6), 381-7; Chen S.F. et al. *Cancer Res.* 1986 Oct; 46(10): 5014-9). Также было показано, что Бреквинар усиливает противораковое действие 5-фторурацила в мышинной модели опухоли толстой кишки 38 через ткань-специфическое модулирование уридиннуклеотидных пулов (G Pizzorno et al. *Cancer Res.* 1992 Apr 1; 52:1660-5).

Ингибиторы ДГОДГ также могут применяться в лечении медиированных вирусом заболеваний (см. US 6,841,561). Более того, известно, что ингибирование ДГОДГ является многообещающей мишенью для лечения отторжения трансплантатов, ревматоидного артрита, псориаза, а также аутоиммунных заболеваний (Kovarik, J.M. et al. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 2003, 8, 47; Allison, A.C. *Transplantation Proc.* (1993) 25(3) Suppl. 2, 8-18; Makowka, L., *Immunolog Rev.* (1993) 136, 51-70; Davis J.P et al. *Biochemistry* 1996, 35: 1270-3).

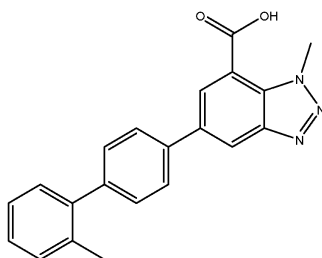
Лефлуноמיד, хорошо известный ингибитор ДГОДГ, является синтетическим лекарственным средством, продаваемым в настоящее время, низкомолекулярным лекарственным средством класса изоксазола (см. EP 0527736, JP 1993506425, JP 1999322700, JP 1999343285, US 5494911, US 5532259, WO 19991017748) и применяемым в лечении ревматоидного артрита, а также оцениваемым для применения в лечении воспалительной болезни кишечника и хронического отторжения аллотрансплантата.

In vivo лефлуноמיד быстро превращается в его активный метаболит Терифлуноמיד, который оказывает противовоспалительное, антипролиферативное и иммунодепрессивное действие через механизмы, которые не полностью поняты. Терифлуноמיד является не только потенциальным ингибитором протеинтирозинкиназы in vivo, но в 100-1000 раз более сильным ингибитором ДГОДГ (Davis J.P et al. *FASEB J* 1996, 10(6): Abst C23; Davis J.P et al. *Biochemistry* 1996, 35:1270-3).

С ростом числа пациентов, страдающих аутоиммунными и сопутствующими заболеваниями, существует неудовлетворенная потребность в новых лекарствах, которые могут более эффективно лечить такие заболевания. По-прежнему существует острая потребность в иммунодепрессантах, которые также полезны при широком разнообразии аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний, включая системную красную волчанку, хронический ревматоидный артрит, рассеянный склероз, сахарный диабет I типа, воспалительные заболевания кишечника, билиарный цирроз печени, увеит и другие расстройства, такие как болезнь Крона, язвенный колит, буллезный пемфигоид, саркоидоз, псориаз, аутоиммунный миозит, гранулематоз Вегенера, ихтиоз, офтальмопатию Грейвса, атопический дерматит и астму. Они также могут применяться в качестве части химиотерапевтических схем лечения раков, лимфом и лейкозов, отдельно или в сочетании с противоопухолевыми соединениями, хорошо известными специалисту в данной области.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в таком лечении. В одном варианте рак выбирают из острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-пролимфоцитарного лейкоза, неходжкинской лимфомы, диффузной В-клеточной лимфомы, анапластической крупноклеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, трижды негативного рака молочной железы, меланомы, рака простаты и рака пищевода. Способ включает стадию введения субъекту один или более раз терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана чувствительность панели ~400 человеческих раковых колоний гемопоэтического и не гемопоэтического происхождения к ингибированию роста соединением 1 в соответствии с данным изобретением. Серые круги представляют колонии клеток, оцененные как чувствительные (демонстрирующие $\geq 75\%$ максимального ингибирования роста и значение $GI_{50} < 1,5$ мкМ).

На фиг. 2 показана чувствительность дополнительной панели колоний рака человека клеточной линии гема к ингибированию роста соединением 1 в соответствии с данным изобретением.

На фиг. 3 показана способность физиологических (5 мкМ) и супрафизиологических (25 мкМ, 100 мкМ) концентраций экзогенного уридина восстанавливать цитотоксическое действие 10 мкМ соединения на указанные колонии рака.

На фиг. 4А показаны профили чувствительности относительной скорости роста к концентрации для колоний клеток MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo и WSU-DLCL2 в отношении изменяющихся концентраций соединения 1.

На фиг. 4В показаны профили чувствительности относительной скорости роста к концентрации для колоний клеток MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo и WSU-DLCL2 в отношении изменяющихся концентраций цитарабина.

На фиг. 4С показаны профили чувствительности относительной скорости роста к концентрации для колоний клеток MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo и WSU-DLCL2 в отношении изменяющихся концентраций доксорубина.

На фиг. 5А показаны кривые роста опухоли MOLM-13 у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) и леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС, измеренные в течение 14 дней.

На фиг. 5В показаны фармакокинетические профили соединения 1 (доза=100 мг/кг, ДРС) в плазме мышей CB17 SCID и в имплантированных опухолях MOLM-13 в указанные моменты времени после последней дозы в конце исследования.

На фиг. 5С показаны уровни ДГО в не леченных (носитель) опухолях MOLM-13 и опухолях, леченных соединением 1, измеренные в течение 12 ч после последней дозы в конце исследования.

На фиг. 5D показаны уровни уридина в не леченных (носитель) опухолях MOLM-13 и опухолях, леченных соединением 1, измеренные в течение 12 ч после последней дозы в конце исследования.

На фиг. 6А показаны полученные у пациента кривые роста опухоли AML1 у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС.

На фиг. 6В показаны полученные у пациента кривые роста опухоли AML2 у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС.

На фиг. 6С показаны полученные у пациента кривые роста опухоли AML3 у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС.

На фиг. 6D показаны полученные у пациента кривые роста опухоли AML4 у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС.

На фиг. 6Е показаны полученные у пациента кривые роста опухоли AML5 у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС.

На фиг. 7А показаны полученные у пациента кривые роста опухоли ДДБККЛ_1 (модель тройного удара) у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС.

На фиг. 7В показаны полученные у пациента кривые роста опухоли ДДБККЛ2 у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 100 мг/кг соединения 1, ДРС.

На фиг. 8 представлена кривая, показывающая относительную скорость роста OCILY18, SC-1 и CARNAVAL колоний клеток двухударной диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДДБККЛ), обработанных различными концентрациями соединения 1 в течение 96 часов.

На фиг. 9А показаны кривые роста опухоли OCILY-19 двухударной диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДДБККЛ) у мышей CB17 SCID, не леченных (носитель) или леченных 10 мг/кг соединения 1, ДРС; 30 мг/кг соединения 1, ДРС; 100 мг/кг соединения 1, ДРС; и 200 мг/кг соединения 1, ОРС, все измеренные в течение 14 дней.

На фиг. 9В показаны фармакокинетические профили соединения 1, введенного в дозах, описанных для фиг. 9А, в плазме мышей CB17 SCID, в указанные моменты времени после последней дозы в конце исследования.

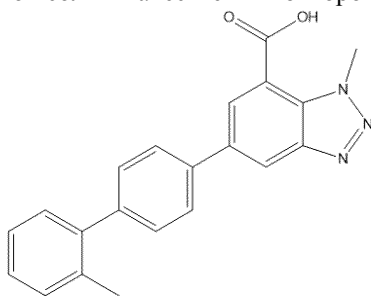
На фиг. 9С показаны уровни ДГО в не леченных (носитель) опухолях OCILY-19 и опухолях, леченных соединением 1 в указанных дозах, измеренных в течение 12 ч после последней дозы в конце исследования.

На фиг. 9D показаны уровни уридина в не леченных (носитель) опухолях OCILY-19 и опухолях, леченных соединением 1 в указанных дозах, измеренных в течение 12 ч после последней дозы в конце исследования.

На фиг. 10 показана кривая относительной скорости роста колонии DU4475 трижды негативного рака молочной железы, леченного различными концентрациями соединения 1 в течение 96 ч.

Подробное описание изобретения

В одном варианте данное изобретение относится к тризамещенному производному бензотриазола (I) или его фармацевтически приемлемой соли в качестве ингибиторов дигидрооротатоксигеназы.



(I).

Это производное применяют в качестве лекарственного средства при лечении рака.

В изобретении представлено применение соединений формулы (I) или их фармацевтически приемлемой соли, включая их смеси во всех соотношениях, в качестве лекарственного средства, через ингибирование активности фермента дигидрооротатоксигеназы при лечении рака.

Соединения формулы (I) и родственных формул также могут применяться как часть химиотерапевтических схем для лечения раков, лимфом и лейкозов, отдельно или в сочетании с классическими противоопухолевыми соединениями, хорошо известными специалисту в данной области техники.

Не ограничивая объем настоящего изобретения, следующие определения предоставлены, чтобы помочь специалистам в данной области техники в понимании подробного описания настоящего изобретения.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает активный ингредиент, который включает соединение формулы (I) в форме одной из его солей, в частности, если эта форма соли придает улучшенные фармакокинетические свойства активному ингредиенту по сравнению со свободной формой активного ингредиента или любой другой солевой формой активного ингредиента, использованной ранее. Фармацевтически приемлемая соль активного ингредиента также может впервые придавать этому активному ингредиенту желаемое фармакокинетическое свойство, которого у него не было ранее, и может даже оказать положительное влияние на фармакодинамику этого активного ингредиента в отношении его терапевтической эффективности в теле.

Фармацевтические составы могут быть адаптированы для введения любым желаемым подходящим способом, например, пероральным (включая буккальный или подъязычный), ректальным, назальным, местным (включая буккальный, подъязычный или трансдермальный), вагинальным или парентеральным (включая подкожный, внутримышечный, внутривенный или внутрикожный) способы. Такие составы могут быть получены с использованием всех способов, известных в области фармацевтики, например, путем сочетания активного ингредиента с эксципиентом(ами) или адьювантом(ами).

Фармацевтические составы, адаптированные для перорального введения, можно вводить в виде отдельных единиц, таких как, например, капсулы или таблетки; порошки или гранулы; растворы или суспензии в водных или не водных жидкостях; съедобные пены или пенные продукты питания; или жидкие эмульсии масло-в-воде или жидкие эмульсии вода-в-масле.

Например, в случае перорального введения в виде таблетки или капсулы компонент активного ингредиента может быть объединен с пероральным, нетоксичным и фармацевтически приемлемым инертным эксципиентом, таким как, например, этанол, глицерин, вода и тому подобное. Порошки получают путем измельчения соединения до подходящего мелкого размера и смешивания его с фармацевтическим эксципиентом, измельченным аналогичным образом, таким как, например, пищевой углевод, такой как, например, крахмал или маннит. Ароматизатор, консервант, диспергатор и краситель также могут присутствовать.

Капсулы получают путем приготовления порошковой смеси, как описано выше, и заполнения ею формованных желатиновых оболочек. Глиданты и смазывающие вещества, такие как, например, высокодисперсная кремниевая кислота, тальк, стеарат магния, стеарат кальция или полиэтиленгликоль в твердой форме, могут быть добавлены к порошковой смеси перед операцией наполнения. Разрыхлитель или солюбилизатор, такой как, например, агар-агар, карбонат кальция или карбонат натрия, также могут быть добавлены для улучшения доступности лекарственного средства после приема капсулы.

Кроме того, если желательно или необходимо, подходящие связующие, смазывающие агенты и разрыхлители, а также красители также могут быть включены в смесь. Подходящие связующие агенты включают крахмал, желатин, натуральные сахара, такие как, например, глюкоза или бета-лактоза, подсластители, сделанные из кукурузы, натуральный и синтетический каучук, такой как, например, аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, воски и подобные. Смазывающие агенты, используемые в этих дозированных формах, включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и подобные. Разрыхлители включают, без ограничений, крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит, ксантановую камедь и подобные. Таблетки составляют, например, приготовлением порошковой смеси, гранулированием или сухим прессованием смеси, добавлением смазывающего вещества и разрыхлителя и прессованием всей смеси с получением таблеток. Порошковую смесь готовят путем смешивания соединения, измельченного подходящим образом, с разбавителем или основанием, как описано выше, и, необязательно, со связующим агентом, таким как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинат, желатин или поливинилпирролидон, замедлителем растворения, таким как, например, парафин, ускорителем абсорбции, таким как, например, четвертичная соль, и/или абсорбентом, таким как, например, бентонит, каолин или дикальцийфосфат. Порошковая смесь может быть гранулирована смазыванием ее связующим агентом, таким как, например, сироп, крахмальная паста, акадийскую смесь растворов камедей или растворы целлюлозы или полимерных материалов, и продавливанием ее через сито. В качестве альтернативы грануляции, порошковая смесь может быть пропущена через таблетировочную машину, с получением кусков неоднородной формы, которые разбиваются с образованием гранул. Гранулы могут быть смазаны добавлением стеариновой кислоты, стеарата, талька или минерального масла, чтобы предотвратить прилипание к формам для литья таблеток. Затем смазанную смесь прессуют с получением таблеток. Активные ингредиенты также могут быть объединены со свободно текучим инертным эксципиентом и затем спрессованы непосредственно с получением таблеток без проведения стадий гранулирования или сухого прессования. Может присутствовать прозрачный или непрозрачный защитный слой, состоящий из герметизирующего слоя шеллака, слоя сахара или полимерного материала и глянцевого слоя воска. Красители могут быть добавлены к этим покрытиям для того, чтобы можно было различать разные дозированные единицы.

Пероральные жидкости, такие как, например, раствор, сиропы и эликсиры, могут быть приготовлены в форме дозированных единиц так, чтобы данное количество включало заранее определенное количество соединений. Сиропы могут быть приготовлены путем растворения соединений в водном растворе с подходящим ароматом, а эликсиры готовятся с использованием нетоксичного спиртового носителя. Суспензии могут быть составлены диспергированием соединений в нетоксичном носителе. Также могут быть добавлены солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты и простые эфиры полиоксиэтиленсорбитола, консерванты, вкусовые добавки, такие как, например, масло перечной мяты или натуральные подсластители или сахарин, или другие искусственные подсластители и подобные.

Составы дозированных единиц для перорального введения, при желании, могут быть заключены в микрокапсулы. Состав также может быть приготовлен таким образом, чтобы высвобождение было увеличено или замедлено, например, путем нанесения покрытия или встраивания материала в виде частиц в полимеры, воск и подобные.

Тризамещенное производное бензотриазола формулы (I) и его фармацевтически приемлемые соли, а также другие активные ингредиенты также могут вводиться в форме липосомных систем доставки, таких как, например, малые однослойные везикулы, крупные однослойные везикулы и многослойные везикулы. Липосомы могут быть образованы из подходящих жиров или фосфолипидов или обоих, таких как, например, холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины или подобные.

Фармацевтические составы, адаптированные для трансдермального введения, могут вводиться в виде независимых пластырей для расширенного, тесного контакта с эпидермисом реципиента. Таким образом, например, активный ингредиент может быть доставлен из пластыря с помощью ионтофореза, как описано в общих чертах в *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986).

Фармацевтические соединения, адаптированные для местного введения, могут быть составлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел.

Для лечения глаз или других внешних тканей, например, рта и кожи, составы предпочтительно наносят в виде мази или крема для местного применения. В случае, когда нужно приготовить мазь, активный ингредиент может применяться либо с парафиновой, либо со смешивающейся с водой основой для крема. Альтернативно, активный ингредиент может быть составлен с получением крема с основой для крема масло-в-воде или основой вода-в-масле.

Фармацевтические препараты, адаптированные для местного нанесения на глаза, включают глазные капли, в которых активный ингредиент растворен или суспендирован в подходящем носителе, в частности, в водном растворителе.

Фармацевтические составы, адаптированные для местного применения во рту, включают таблетки для рассасывания, пастилки и жидкости для полоскания рта.

Фармацевтические составы, адаптированные для ректального введения, могут вводиться в форме

суппозиторийев или клизм.

Фармацевтические составы, адаптированные для назального введения, в которых вещество-носитель представляет собой твердое вещество, содержат грубый порошок с размером частиц, например, в диапазоне 20-500 мкм, который вводят способом, которым принимается нюхательный порошок, т.е. путем быстрого вдыхания через носовые проходы из контейнера, содержащего порошок, который держат близко к носу. Подходящие составы для введения в виде назального спрея или капель в нос с жидкостью в качестве вещества-носителя включают растворы активного ингредиента в воде или масле.

Фармацевтические составы, адаптированные для введения путем ингаляции, охватывают мелко-дисперсную пыль или туман, которые могут быть получены различными типами распылителей под давлением с аэрозолями, распылителями или инсуффляторами.

Фармацевтические составы, адаптированные для вагинального введения, могут быть введены в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев. Фармацевтические составы, адаптированные для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, содержащие антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, с помощью которых состав становится изотоническим к крови лечимого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспензионные среды и загустители. Составы могут быть введены в контейнерах с однократной дозой или несколькими дозами, например, в запаянных ампулах и флаконах, и храниться в высушенном вымораживанием (лиофилизированном) состоянии, так что требуется только добавление стерильной жидкости-носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением.

Инъекционные растворы и суспензии, приготовленные в соответствии с рецептурой, могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Само собой разумеется, что, в дополнение к отдельно упомянутым выше составляющим, составы могут также включать другие агенты, обычные в данной области техники, с учетом конкретного типа состава; таким образом, например, составы, которые подходят для перорального введения, могут содержать ароматизаторы.

Терапевтически эффективное количество соединения формулы (I) зависит от ряда факторов, включая, например, возраст и вес животного, точное заболевание, которое требует лечения и его тяжесть, природу состава и способ введения, и, в конечном итоге, определяется лечащим врачом или ветеринаром. Однако эффективное количество соединения обычно составляет от 0,1 до 100 мг/кг массы тела реципиента (млекопитающего) в сутки, и обычно, в интервале от 1 до 10 мг/кг массы тела в сутки. Таким образом, фактическое количество в сутки для взрослого млекопитающего, весящего 70 кг, обычно составляет от 70 до 700 мг, где это количество можно вводить в виде отдельной дозы в сутки или обычно в виде серии частичных доз (таких как, например, две, три, четыре, пять или шесть) в сутки, так что общая суточная доза остается одинаковой. Эффективное количество соли может быть определено как доля эффективного количества соединения как такового.

В еще одном варианте, данное изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающему стадию введения субъекту одного или нескольких раз терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, описанного здесь.

В еще одном варианте, данное изобретение относится к способу ингибирования роста и/или метастазов опухолевых клеток у субъекта, включающему стадию введения субъекту одного или нескольких раз терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, описанного здесь.

Соединения, их фармацевтически приемлемые соли и фармацевтические составы и композиции, описанные в данном описании, являются полезными для лечения рака у субъекта, нуждающегося в таком лечении. Одновременно могут быть ингибированы рост опухолевых клеток и/или метастазы или активность фермента дигидрооротатоксигеназы. Соединения и фармацевтическая композиция могут вводиться один или несколько раз для достижения терапевтического эффекта. Как известно в данной области, специалист в данной области техники способен определить дозу, режимы дозирования и пути введения в зависимости от состояния, подлежащего лечению, и субъекта, нуждающегося в лечении. Типовые примеры рака включают гематологические злокачественные образования, такие как, но не ограниченные ими, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, В-пролимфоцитарный лейкоз. Типовые примеры рака включают лимфомы, такие как, но не ограниченные ими, неходжкинская лимфома, диффузная В-крупноклеточная лимфома, анапластическая крупноклеточная лимфома и мантийно-клеточная лимфома. Типовые примеры рака включают солидный рак, такой как, но не ограниченный ими, трижды негативный рак молочной железы, меланому, рак простаты и рак пищевода.

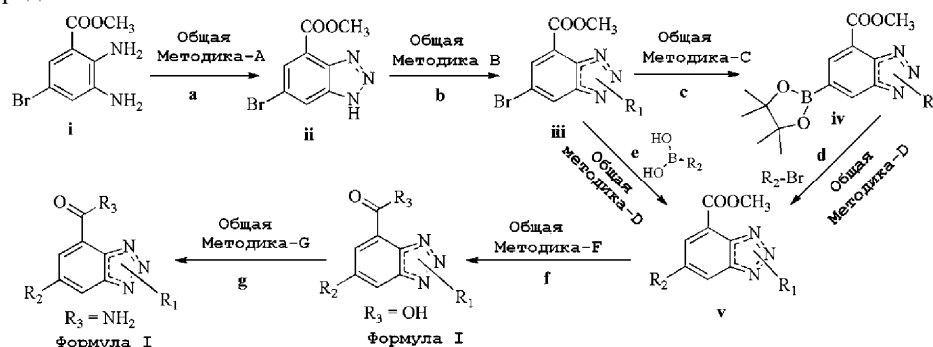
Ингибиторы дигидрооротатдегидрогеназы формулы (I) могут быть получены из легкодоступных материалов с применением следующих общих способов и методик. Должно быть понятно, что, если даны типовые или предпочтительные экспериментальные условия (т. е. температуры реакции, время, моли реагентов, растворители и т. д.), другие экспериментальные условия также могут применяться, если не указано иное. Оптимальные условия реакции могут варьироваться в зависимости от конкретных исполь-

зуемых реагентов или растворителей, но такие условия могут быть определены специалистом в данной области с использованием рутинных процедур оптимизации. Кроме того, используя подробно описанные процедуры, специалист в данной области может получить дополнительные соединения в соответствии с данным изобретением, заявленные здесь. Все температуры приведены в градусах Цельсия ($^{\circ}\text{C}$), если не указано иное.

Следующие аббревиатуры относятся соответственно к определениям ниже: АсОН (уксусная кислота), АЦН (ацетонитрил), АТФ (аденозин трифосфат), АБС (альбумин бычьей сыворотки), CHCl_3 (хлороформ), Cs_2CO_3 (карбонат цезия), ДХМ (дихлорметан), ДИПЭА (диизопропилэтиламин), ДМСО (диметилсульфоксид), ДМФ (N,N -диметилформамид), EDCl.HCl (гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида), Et_3N (триэтиламин), EtOAc (этилацетат), EtOH (этанол), ГОБТ (гидроксibenзотриазол), HCl (гидрохлорид), K_2CO_3 (карбонат калия), KOAc (ацетат калия), мин (минута), MeOH (метанол), MeI (метилиодид), MgSO_4 (сульфат магния), NH_4Cl (хлорид аммония), $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ (карбонат аммония), $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ ([1,1-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II)), NaN (гидрид натрия), NaNO_2 (нитрит натрия), NaHCO_3 (бикарбонат натрия), ПетЭфир (петролейный эфир), ФРФБ (физиологический раствор с фосфатным буфером), КТ-комнатная температура (25°C - 35°C), ТЭА (триэтиламин), ТФК (трифторуксусная кислота), ТГФ (тетрагидрофуран), $t\text{-BuOK}$ (трет-бутоксид калия), ТМСИ (триметилсилилидид), ТСХ (тонкослойная хроматография), H_2O - вода; мл - миллилитр; ч - час; N - нормальность; M - молярность; c - синглет; d - дублет; t - триплет; m - мультиплет; ^1H ЯМР - протонный ядерный магнитный резонанс; МС - масс-спектрометрия; ЖХ - жидкостная хроматография; ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография; J - константа сочетания; ^1H - протон; МГц - мегаГерц (частота); Гц - Герц; м.д. - миллионная доля; шс - широкий синглет; ЭР - электрораспыление; конц. - концентрированный; г - грамм; ммоль или mM - миллимолярный; мкM - микромолярный; нM - наномолярный; УФ - ультрафиолет; $^{\circ}\text{C}$ - градусы Цельсия, M^+ - молекулярный ион, % - процент; мкм - микрон; и δ - дельта; безв. - безводный; pH - водородный ион.

В другом варианте данного изобретения представлены способы, применяемые для получения соединений формулы (I), представленных в примерах ниже и в общем описанных на схеме I. Специалист в данной области техники поймет, что схема I может быть адаптирована для получения соединений формулы (I) и фармацевтически приемлемых солей соединений формулы (I) в соответствии с данным изобретением. Где все символы/переменные такие, как описаны выше, если не указано иное.

Способ представлен схемой I



Соединения в соответствии с данным изобретением могут быть получены с применением синтетических превращений, иллюстрированных на схеме I. Исходные материалы являются коммерчески доступными, могут быть получены с помощью методик, описанных здесь, с помощью литературных методик или с помощью методик, которые могут быть хорошо известны специалисту в области органической химии. Исходное вещество 5-замещенный метил 2,3-диаминобензоат получают по методикам, описанным в WO 2010115736 A2.

Стадия-а: соединение-**i** подвергают взаимодействию с нитритом натрия в кислой среде с применением общей методики-А с получением соединения-**ii**.

Стадия-б: соединение-**ii** далее подвергают N-алкилированию с применением метилиодида в основных условиях, таких, как описаны в общей методик -В с получением соединения формулы-**iii**.

Стадия-с: соединения формулы-**iii** подвергают взаимодействию с дибораном биспинаколата в основной среде в присутствии подходящего палладиевого катализатора с применением общей методики-С с получением соединений формулы-**iv**.

Стадия-д: соединения формулы-**iv** обрабатывают замещенным арилгалогенидом в присутствии подходящего палладиевого катализатора с применением условий, таких как описаны в общей методике-Д с получением соединений формулы-**v**.

Стадия-е: альтернативно соединения формулы-**v** могут быть получены из соединений формулы-**iii** с применением подходящих бороновых кислот, в подходящих условиях, таких, как описаны в общей методике-Д.

Стадия-ф: полученные соединения формулы-**v** подвергают гидролизу со сложным эфиром в основ-

ных условиях, таких как описаны в общей методике-F с получением соединений формулы (I) (где $R_3=OH$).

Если вышеуказанный набор общих способов синтеза не применим для получения соединений формулы (I) и/или необходимых промежуточных соединений для синтеза соединений формулы (I), следует использовать подходящие способы получения, известные специалисту в данной области. Как правило, пути синтеза для любого отдельного соединения формулы (I) будут зависеть от конкретных заместителей каждой молекулы и от доступности необходимых промежуточных соединений; опять же, такие факторы известны специалистам в данной области.

Соединения в соответствии с данным изобретением могут быть выделены в сочетании с молекулами растворителя путем кристаллизации при испарении подходящего растворителя. Фармацевтически приемлемые кислотнo-аддитивные соли соединений формулы (I), которые содержат основной центр, могут быть получены общепринятым способом. Например, раствор свободного основания может быть обработан подходящей кислотой либо в чистом виде, либо в подходящем растворе, и полученная соль выделена либо фильтрацией, либо выпариванием в вакууме реакционного растворителя. Фармацевтически приемлемые основнo-аддитивные соли могут быть получены аналогичным образом путем обработки раствора соединений формулы (I) подходящим основанием. Оба типа солей могут быть сформированы или взаимопревращены с использованием методик с применением ионообменной смолы.

Хотя изобретение иллюстрируется некоторыми из следующих примеров, его не следует истолковывать как ограниченное ими; скорее, изобретение охватывает общую область, как описано выше. Различные модификации и варианты осуществления могут быть сделаны без отклонения от сущности и объема.

Примеры

Общие моменты.

Данные МС, представленные в примерах, описанных ниже, получают следующим образом: масс-спектр: LC/MS Waters ZMD (ESI) или Waters Acquity SOPC (ESI).

Данные ЯМР, представленные в примерах, описанных ниже, получают следующим образом: 1H -ЯМР: Bruker DPX-300 MHz или Bruker DPX 400 MHz.

Данные ВЭЖХ, представленные в примерах, описанных ниже, получают следующим образом.

Условия А: колонка Waters Xbridge™ C₈ 50 мм × 4,6 мм с потоком 2 мл/мин; 8 градиент от 0,1% ТФК в H₂O до 0,07% ТФК в CH₃CN.

Условия В: C18 BDS (4,6×250) мм, SCV244 с потоком 0,7 мл/мин; 10 мин градиент от 0,1% ТФК в H₂O до CH₃CN.

Условия препаративной ВЭЖХ: колонка Zorbax Eclipse XDB C18 PrepHT (150 × 21,2 мм, 5 мкм); подвижная фаза: (А) 0,01% ТФК или 0,1% ТФК; (В) АЦН или АЦН:MeOH (1:1).

Поток: 20 мл/мин.

Очистки препаративной ВЭЖХ проводят с аппаратом масс-направленного самоочищения Fractionlynx от Waters, оборудованным колонкой Sunfire Prep C18 OBD 19×100 мм 5 мкм, если не указано иначе. Все очистки ВЭЖХ проводят с градиентом АЦН/H₂O или АЦН/H₂O/HCOOH (0,1%).

Соединения в соответствии с данным изобретением названы по стандартам, применяемым в программе ACD/Name Batch от "Advanced Chemistry Development Inc., ACD/Labs (7,00 Release)". Версия продукта: 7,10, созданная: 15 сентября 2003.

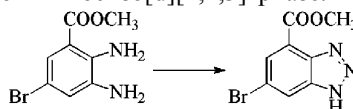
Методика для соединений формулы (I) подробно описана ниже в общих методиках, включая общий синтез различных промежуточных соединений, участвующих в процессе получения соединений в соответствии с данным изобретением.

Общая методика-А: получение замещенных [1,2,3]бензотриазолов.

В колбу, содержащую 6-замещенный или замещенный сложный диаминоэфир (1-3 экв.) в уксусной кислоте перемешивают в течение 10-20 мин, предпочтительно 10 мин, с последующим добавлением (нитрита натрия, нитрита калия, предпочтительно нитрита натрия) (2,5-3,5, предпочтительно 2,5 экв.) в воде. Реакционную смесь перемешивают в течение 1-2 ч, предпочтительно 1 ч при КТ. Отделенное твердое вещество собирают фильтрацией и сушат в вакууме с получением целевых продуктов.

Иллюстративный пример общей методики-А.

Получение А.1: синтез метил 6-бром-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилата



Раствор метил 2,3-диамино-5-бромбензоата (1,0 г, 4,08 ммоль) (ссылка: WO 2010/115736 A2) в уксусной кислоте (15 мл) перемешивают в течение 10 мин при КТ. Добавляют нитрит натрия (0,309 г, 4,48 ммоль) в воде (2 мл), и реакционную смесь перемешивают в течение около 30 мин при КТ. Выпавшее в осадок твердое вещество фильтруют, промывают водой и сушат в вакууме с получением желаемого продукта (0,8 г, 77%);

1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 16,19 (с, 1H), 8,70 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 3,99 (с, 3H) и ЖХ-МС m/z:

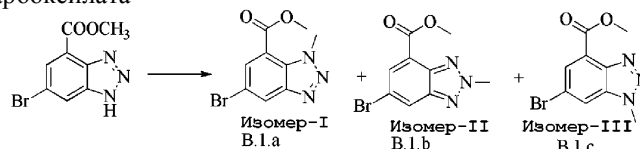
258 (M+H)⁺.

Общая методика-B: N-алкилирование замещенных бензотриазолов.

К перемешиваемому раствору замещенных бензотриазолов-производного карбоксилата (1 экв.) в органическом растворителе (таком как ДМФ, ТГФ, диоксан, предпочтительно ДМФ) добавляют подходящее основание (такое как K₂CO₃, Cs₂CO₃, NaNH и т.д., предпочтительно K₂CO₃, 2-5 экв., предпочтительно 2 экв.) затем алкилгалогенид (2-5 экв., предпочтительно 3 экв.). Реакционную смесь перемешивают при КТ в течение около 1-10 ч (предпочтительно 3 ч). Реакционную смесь выливают в ледяную воду, и отделившееся твердое вещество собирают фильтрацией и сушат в вакууме. Региоизомеры разделяют хроматографией на колонке с получением желаемых продуктов.

Иллюстративный пример общей методики-B.

Получение В.1: синтез метил 5-бром-1-метил-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилата, метил 6-бром-2-метил-2Н-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилата и метил 6-бром-1-метил-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилата



К перемешиваемому раствору метил 6-бром-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-4-карбоксилата (4,5 г, 17,5 ммоль, получение А.1) в ДМФ (25 мл) добавляют карбонат калия (4,85 г, 35,15 ммоль), затем метилиодид (7,48 г, 52,73 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при КТ в течение 1 ч. Реакционную смесь гасят ледяной водой (100 мл) и отделившееся твердое вещество собирают фильтрацией, сушат в вакууме. Полученное неочищенное соединение очищают хроматографией на колонке с силикагелем (100-200 меш) с применением 10% этилацетата в гексане с получением изомера-I (В.1.а) (1,9 г);

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,40 (с, 1H), 8,22 (с, 1H), 4,57 (с, 3H), 4,01 (с, 3H) и ЖХ-МС m/z: 272 (M+2)⁺; 15-20% этилацетата в гексане с получением изомера-II (В.1.б) (1,4 г);

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,26 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 4,58 (с, 3H), 4,04 (с, 3H) и ЖХ-МС m/z: 272,0 (M+2)⁺; 20-25% этилацетата в гексане с получением изомера-III (В.1.с) (1,0 г);

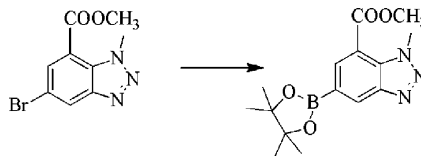
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,67 (с, 1H), 8,13 (с, 1H), 4,45 (с, 3H), 3,96 (с, 3H) и ЖХ-МС m/z: 272,0 (M+2)⁺.

Общая методика-C: получение боронового эфира.

Смесь производного галогенарила (1,0-3,0 экв., предпочтительно 1,0 экв.), подходящего неорганического основания (такого как KOAc или Na₂CO₃ или K₂CO₃ или Cs₂CO₃, предпочтительно KOAc), диборана биспинаколата (1,0-3,0 экв., предпочтительно 1,1 экв.) в диоксане дегазируют с азотом в течение около 10-15 мин, и добавляют [1,1-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (0,001-0,010 экв., предпочтительно 0,05 экв.). Реакционную смесь перемешивают при температуре кипения с обратным холодильником под азотом в течение около 3-12 ч (предпочтительно около 6 ч). Реакционную смесь охлаждают до КТ и выпаривают досуха при пониженном давлении. Остаток повторно растворяют в EtOAc, промывают последовательно водой и солевым раствором. Органический раствор сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт очищают кристаллизацией или растиранием из подходящего растворителя или растворителей или препаративной ВЭЖХ или флэш-хроматографией.

Иллюстративный пример общей методики-C.

Получение С.1: синтез метил 1-метил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилата



Смесь метил 5-бром-1-метил-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилата (1,0 г, 3,7 ммоль, получение В.1.а), ацетата калия (0,627 г, 5,92 ммоль), диборана биспинаколата (0,93 г, 3,7 ммоль) в диоксане (60 мл) дегазируют азотом в течение около 15 мин и добавляют [1,1-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) (0,151 г, 0,018 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре кипения с обратным холодильником в течение 6 ч под азотом. Реакционную смесь охлаждают до КТ и выпаривают досуха при пониженном давлении. Полученный остаток повторно растворяют в EtOAc, промывают последовательно водой и солевым раствором и концентрируют. Полученное неочищенное соединение очищают хроматографией на колонке с силикагелем (60-120 меш) с применением 30% этилацетата в гексане с получением желаемого продукта (0,9 г, 77%);

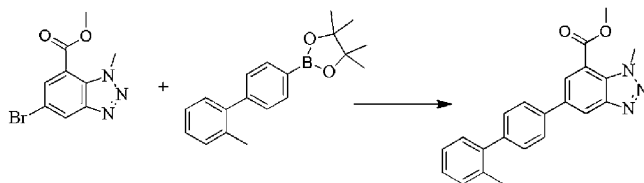
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,46 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 4,59 (с, 3H), 3,94 (с, 3H), 1,35 (с, 12H) и ЖХ-МС m/z=318,2 (M+H)⁺.

Общая методика-D: реакция Сузуки.

Смесь ацетонитрила и воды (8:2) дегазируют азотом в течение около 10-15 мин, затем добавляют подходящее основание (такое как Na_2CO_3 или K_2CO_3 или Cs_2CO_3 , предпочтительно Na_2CO_3), затем производное арилброма (1,0-3,0 экв., предпочтительно 1,0 экв.) и подходящую бороновую кислоту (1,0-3,0 экв., предпочтительно 1,5 экв.). Реакционную смесь снова дегазируют в течение 15 мин и, наконец, добавляют [1,1-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (0,001-0,010 экв., предпочтительно 0,05 экв.). Реакционную смесь перемешивают при температуре кипения с обратным холодильником под азотом в течение около 3-12 ч (предпочтительно около 4 ч). Реакционную смесь охлаждают до КТ и выпаривают досуха при пониженном давлении. Полученный остаток повторно растворяют в EtOAc, промывают последовательно водой и соевым раствором. Органический раствор сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт очищают кристаллизацией или растированием из подходящего растворителя или растворителей или препаративной ВЭЖХ или флэш-хроматографией.

Иллюстративный пример общей методики-D.

Получение D.1: синтез метил 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-бифенил]-4-ил)-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилат



Смесь ацетонитрила (80 мл) и воды (15 мл) дегазируют азотом в течение 10 мин. Добавляют карбонат натрия (2,74 г, 25,9 ммоль), затем метил 5-бром-1-метил-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилат (3,5 г, 12,9 ммоль) и 4,4,5,5-тетраметил-2-(2'-метил-[1,1'-бифенил]-4-ил)-1,3,2-диоксаборолан (3,81 г, 12,0 ммоль) (С.1.5). Реакционную смесь снова дегазируют в течение 15 мин. Наконец, добавляют [1,1-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) (0,526 г, 0,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре кипения с обратным холодильником в течение 5 ч под азотом. Реакционную смесь охлаждают до КТ и выпаривают досуха при пониженном давлении. Полученный остаток повторно растворяют в EtOAc, промывают последовательно водой и соевым раствором и концентрируют. Полученное неочищенное соединение очищают хроматографией на колонке с силикагелем (60-120 меш) с применением 30% этилацетата в гексане с получением желаемого продукта (3,6 г, 77%);

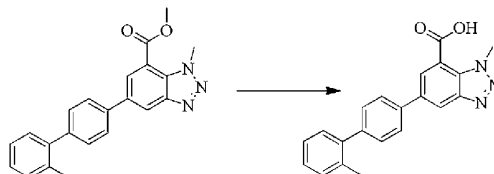
^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,52 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 7,76-7,74 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,48-7,46 (д, $J=7,6$, 2H), 7,31-7,28 (м, 4H), 4,63 (с, 3H), 4,08 (с, 3H), 2,34 (с, 3H) и ЖХ-МС $m/z=358,2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Общая методика-F: гидролиз сложного эфира.

В колбу, содержащую подходящий сложный алкиловый эфир в водном органическом растворителе (таком как ТГФ или метанол, 1,4 диоксан, предпочтительно 1,4 диоксан) добавляют 1,5 экв. водного раствора гидроксида натрия, и реакционную смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1-8 ч. (предпочтительно 4 ч). Завершение реакции отслеживают ТСХ. Избыток растворителя удаляют в вакууме, и раствор подкисляют 10% раствором HCl. Отделенное твердое вещество собирают фильтрацией и сушат в вакууме с получением целевого производного карбоновой кислоты. Необязательно, целевое соединение может быть очищено кристаллизацией, или растированием из подходящего растворителя или растворителей, или препаративной ВЭЖХ или флэш-хроматографией.

Иллюстративный пример общей методики-F.

Пример 1: синтез 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-бифенил]-4-ил)-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоновой кислоты (соединение-1)



К перемешиваемому раствору метил 1-метил-5-(2'-метил-[1,1'-бифенил]-4-ил)-1Н-бензо[d][1,2,3]триазол-7-карбоксилата (1,2 г, 3,361 ммоль, D.1) в 1,4 диоксане (15 мл) добавляют водн. 2N NaOH (15 мл). Реакционную смесь кипятят с обратным холодильником в течение 4 ч. После завершения реакции реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, избыточный растворитель удаляют при пониженном давлении, и раствор подкисляют 10% раствором HCl (pH ~2). Отделенное твердое вещество собирают фильтрацией и сушат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде беловатого твердого вещества (1,1 г, 95%);

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,35 (шс, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 7,89-7,87 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,51-7,49 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,32-7,25 (м, 4H), 4,58 (с, 3H) 2,30 (с, 3H) и ЖХ-МС $m/z=344,1$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Фармакологическая активность

Измерение активности, ингибирующей фермент ДГОДГ (анализы *in vitro*).

Анализ активности ДГОДГ представляет собой сопряженный ферментный анализ, в котором окисление ДГО и последующее восстановление убихинона являются стехиометрически эквивалентным восстановлению DCIP (2,6-дихлорфенола). Восстановление DCIP сопровождается потерей абсорбции при 610 нм.

Получение растворов/реагентов.

Получение буфера: 50 мМ трис HCl, 150 мМ KCl и pH 8,0, 0,8% тритон.

Исходный раствор L-дигидрооротовой кислоты 20 мМ в буфере.

Исходный раствор гидрата натриевой соли 2,6-дихлориндофенола 20 мМ в буфере.

Исходный раствор децилубихинона 20 мМ в буфере.

ДМСО применяют в качестве носителя.

Методика.

5 мкл диметилсульфоксида или соединения формулы (I) в растворе ДМСО добавляют в лунки 96-луночного планшета. Соединения формулы (I) измеряют при 10 мкМ.

Добавляют белок вместе с буфером так, чтобы общий объем, включая ДМСО, составлял 87 мкл. Соединение и белок инкубируют в течение получаса при комнатной температуре после смешивания. 5 мкл 20 мМ раствора L-дигидрооротовой кислоты, 5 мкл 2 мМ раствора децилубихинона и 3 мкл 2 мМ раствора гидрата натриевой соли 2,6-дихлориндофенола добавляют к полученному выше раствору (общий аналитический объем 100 мкл). Смесь перемешивают в течение 2 мин, и абсорбцию записывают каждые 10 мин при 610 нм.

Процент ингибирования рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \{ (Abs_{610} \text{ для реакционной смеси, содержащей соединение}) - (Abs_{610} \text{ для положительного контроля}) \} / \{ (Abs_{610} \text{ для реакционной смеси без фермента}) - (Abs_{610} \text{ для положительного контроля}) \}.$$

Реакционная смесь, содержащая соединение, содержит соединение, буфер, фермент и субстраты.

Положительный контроль содержит ДМСО, буфер, фермент и субстраты.

Реакционная смесь без фермента содержит ДМСО, буфер и субстраты.

Определение IC_{50} .

Готовят 2 мМ исходный раствор ДМСО выбранных тризамещенных производных бензоимидазола и бензотриазола формулы (I) в соответствии с данным изобретением для исследования. Затем проводят разведения 1/3.

5 мкл каждого исходного раствора соединения формулы (I) применяют для каждого 100 мкл анализа. Следовательно, 5 мкл 2 мМ исходного раствора дают 100 мкл 100 мкМ раствора соединения формулы (I) при разведении буфером, белком и субстратом. См. также: Ulrich et al. (2001) *Em. J. Biochem.*, 268, 1861-1868.

Значения IC_{50} выбранных соединений в соответствии с данным изобретением представлены в таблице ниже, соединения, демонстрирующие значения $IC_{50} \leq 0,1$ мкМ группируют как "a", соединения, демонстрирующие значения IC_{50} в интервале от 0,101 мкМ до 1,0 мкМ группируют как "b", и соединения, демонстрирующие значения $IC_{50} > 1,0$ мкМ группируют как "c".

Ингибирующее действие на ДГОДГ выбранных соединений

Группа	Соединения №№
a	1

Клеточная активность

Анализ пролиферации Ramos (анализы *in vitro*).

Анализ пролиферации клеток является чувствительным способом количественного определения жизнеспособных клеток в анализе цитотоксичности или пролиферации. Система ХТТ (внутренней соли 2,3-бис[2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил]-2Н-тетразолий-5-карбоксиянилида) является средством измерения активности живых клеток через митохондриальные дегидрогеназы. Митохондриальные дегидрогеназы живых клеток расщепляют тетразолиево кольцо ХТТ с получением оранжевых кристаллов формазона, которые растворимы в водных растворах. Раствор ХТТ потенцируют добавлением электронного сочетающего агента, метосульфата феназина (МСФ) в реакционную смесь. Полученный оранжевый цвет спектрофотометрически измеряют при 450 нм. Повышение или снижение количества клеток дает сопутствующее изменение количества образовавшегося формазона, показывая степень цитотоксичности, вызванной тестируемым продуктом.

Получение растворов/реагентов.

Получение среды.

Растворяют 17,7 г порошка IMDM (среды Дульбекко в модификации Искова), 1,5 г бикарбоната натрия, pH 7,2-7,4, в 1 л воды MiliQ, добавляют 1% пенициллин/стрептомицин и 10% ФТС.

Растворяют 10,6 г порошка Ham's F12, 1,5 г бикарбоната натрия, pH 7,2-7,4, в 1 л воды MiliQ, добавляют 1% пенициллина/стрептомицина.

ДМСО применяют в качестве носителя.

1× ФРФБ (физиологический раствор с фосфатным буфером): растворяют 5 таблеток ФРФБ (Sigma: Cat#P4417) в 1 л воды MilliQ.

Методика (определение IC₅₀).

Клетки Ramos ресуспендируют до плотности 1×10^5 клеток/мл в полной среде IMDM. 95 мкл этой суспензии добавляют в 96-луночный планшет для высевания ~10000 клеток на лунку. Планшеты инкубируют при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в течение ~1 ч до добавления соединения.

Тестируемые соединения (см. табл. 1) растворяют в 100% ДМСО с получением 2/6/10/20 мМ исходного раствора. 200× концентрацию требуемой конечной концентрации готовят в ДМСО. 10 мкл каждой концентрации (200×) затем разводят в 90 мкл не содержащей сыворотки среды Ham's F12 с получением промежуточной концентрации 20× в среде. Концентрация ДМСО на этой стадии составляет 10% (промежуточное разведение). 5 мкл каждого промежуточного разведения затем добавляют трижды в ранее засеянный 96-луночный планшет. Конечная концентрация ДМСО составляет 0,5% в экспериментальных лунках. Клетки, обработанные 0,5% ДМСО, служат положительным контролем. 100 мкл полной среды IMDM служат массовой пробой для анализа данных. 200 мкл 1× ФРФБ добавляют во все угловые лунки аналитического планшета. Планшеты затем инкубируют в течение 72 ч в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C.

В день окончания 100 мкл раствора ХТТ (1 мг/мл ХТТ с добавлением 25 мкМ МСФ в среде Ham's F12) добавляют в каждую лунку. Планшеты инкубируют в течение 2 ч. Количество полученного формазона определяют считыванием абсорбции планшета с применением многоканального планшетного ридера VICTOR X5 при длине волны 450 нм. Значения IC₅₀ определяют как концентрации, которые снижают жизнеспособность клеток на 50%, и кривые строят с помощью GraphPad Prism 6.0.

Процент ингибирования рассчитывают следующим образом.

Процент ингибирования (%) рассчитывают нормализацией контрольных значений ДМСО до 100% с применением формулы:

$$\% \text{ ингибирования} = 100\% - (\text{Abs}_{450}^{\text{тестируемое соединение-проба}}) / (\text{Abs}_{450}^{\text{положительный контроль-проба}}) \times 100$$

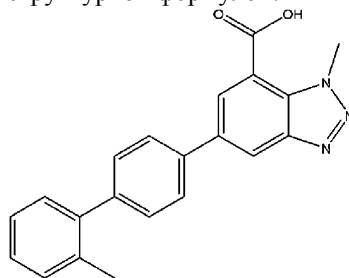
Тестируемое соединение содержит клетки, тестируемое соединение, среду IMDM и 0,5% ДМСО.

Положительный контроль содержит клетки, среду IMDM и 0,5% ДМСО. Проба содержит среду IMDM.

Соед. №	Максимальный % ингибирования при 30 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
1	107	0,049

In vitro ингибирование роста множества колоний клеток рака человека соединением 1.

Проводят скрининг панели колоний раковых клеток, целью которого является идентификация подмножеств раковых клеток, которые особенно чувствительны к ингибированию ДГОДГ соединением 1. Соединение 1 представлено следующей структурной формулой:



Эти колонии клеток обрабатывают соединением 1 в течение всего 72 ч.

Оценка скорости роста опухоли через 72 ч обработки, показанная на фиг. 1 и в табл. 1, показала, что определенное подмножество колоний клеток (изображенное серыми точками на фиг. 1) чувствительно к соединению 1. Большинство колоний клеток, демонстрирующих высокую чувствительность к соединению 1, имеют гемопозитическое происхождение, хотя некоторые солидные опухоли также демонстрируют высокую чувствительность (таблица 1). Для целей получения фиг. 1, чувствительные колонии клеток были определены как демонстрирующие >75% от максимального ингибирования роста и имеющие значение GI₅₀ <1,5 мкМ. В табл. 1 представлен список некоторых чувствительных к соединению 1 колоний клеток вместе со значениями GI₅₀ и максимальной реакцией роста. Максимальное ингибирование 100 представляет полное ингибирование роста; максимальное значение ингибирования >100 представляет смерть клеток.

Последующий скрининг проводят на расширенной панели колоний клеток линии гема в 4-дневном анализе роста. Рост оценивают измерениями Cell-Titer Glo в день 0 и день 4. Как показано на фиг. 2, 25% проверенных гемовых колоний (20/80) демонстрируют чувствительность к соединению 1, из которых колонии диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДДБКЛ) были особенно чувствительными (8/11 или 73%). Подмножество гемовых колоний, которые имели промежуточную чувствительность (определенную как >50% и <75% ингибирование скорости роста) или отсутствие чувствительности (определенное

как <50% ингибирование скорости роста) к соединению 1 в этом последующем скрининге, подвергают расширенным исследованиям роста для оценки того, изменяет ли увеличенное время обработки их профиль чувствительности. Более конкретно, эти гемовые колонии предварительно обрабатывают соединением 1 в течение трех дней указанными концентрациями, и затем повторно высевают на планшеты для стандартного 4-дневного анализа роста в свежей среде/лекарственном средстве. Подавляющее большинство повторно тестируемых гемовых колоний демонстрировали сильную чувствительность к соединению 1 через 7 дней лечения соединением 1 (табл. 2).

Таблица 1
GI₅₀ и максимальное ингибирование роста различных колоний клеток,
обработанных соединением 1

Колония клеток	Первичное место	Заболевание	GI ₅₀ (мкМ)	Максимальное ингибирование роста
OCILY8	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	Диффузная В-крупноклеточная лимфома	0,02	148,2
SUDHL5	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	Диффузная В-крупноклеточная лимфома	0,02	117,2
JVM13	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	В-пролимфоцитарный лейкоз	0,02	112,0
MINO	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	Мантийноклеточная лимфома	0,03	144,9
SUDHL1	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	Анапластическая крупноклеточная лимфома	0,04	186,5
SR786	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	Анапластическая крупноклеточная лимфома	0,05	96,3
MOLM13	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	острый миелоидный лейкоз	0,06	133,8
RL	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	Неходжкинская лимфома	0,08	87,0
DU4475	Молочная железа	Трижды негативный рак молочной железы	0,10	137,4
JYSE150	Пищевод	Рак пищевода (плоскоклеточная карцинома пищевода)	0,10	78,4
KYSE510	Пищевод	Рак пищевода (плоскоклеточная карцинома пищевода)	0,13	97,5
SUM159PT	Молочная железа	Трижды негативный рак молочной железы	0,14	91,2
MV411	Гемопозитическая и лимфоидная ткань	Детский острый миелоидный лейкоз	0,27	835
DU145	Простата	Рак простаты	0,48	84,9
CJM	Кожа	Меланома	0,62	77,4

Таблица 2

4-дневная и 7-дневная чувствительность различных гемовых колоний клеток,
обработанных соединением 1

Колония клеток	Заболевание	Чувствительность	
		4-дня	7-дней
REC-1	Мантийноклеточная лимфома	*	***
SUDHL4	Диффузная В-крупноклеточная лимфома	**	***
U266B1	Множественная миелома	*	***
LP1	Множественная миелома	*	***
MOLP-2	Множественная миелома	**	***
KG-1	Острый миелоидный лейкоз	*	***
KMS12BM	Множественная миелома	**	***
ВДХМ	Острый миелоидный лейкоз	**	***
HuNS1	Множественная миелома	*	***
GDM-1	Острый миелоидный лейкоз	*	**
SKNO-1	Острый миелоидный лейкоз	*	**
Kasumi-3	Острый миелоидный лейкоз	*	*
Kasumi-6	Острый миелоидный лейкоз	*	*
F36P	Острый миелоидный лейкоз	**	***
THP-1	Острый миелоидный лейкоз	**	***
AML-193	Острый миелоидный лейкоз	**	***
TF1	Острый миелоидный лейкоз	*	***
HEL	Острый миелоидный лейкоз	**	***
* – не чувствительные			
** – промежуточные			
*** – чувствительные			

Ингибирование роста раковых клеток соединением 1, связанное с ингибированием ДГОДГ.

ДГОДГ катализирует четвертую стадию *de novo* биосинтеза пиримидина, окисляя дигидрооротат до оротата во внутренней мембране митохондрий. Затем оротат объединяется с фосфорибозилпирофосфатом (ФРПФ) с образованием оротидин-5'-монофосфата (ОМФ). Уридин монофосфат (УМФ) в конечном итоге получают из ОМФ в цитозоле, где он используется для получения пиримидинов для биосинтеза РНК/ДНК, а также для других важных функций биосинтеза, таких как гликозилирование белков/жиров и образование фосфолипидов для биосинтеза мембран.

Чтобы подтвердить, что влияние соединения 1 на ухудшение роста/жизнеспособности клеток обусловлено специфическим ингибированием ДГОДГ, были проведены анализы роста клеток с различными количествами уридина, добавленного в среду. Добавка в среду концентраций уридина, близких к физиологическим (5 мкМ), частично восстанавливает действие соединения 1, в то время как супрафизиологические концентрации (25 и 100 мкМ) полностью восстанавливают действие на рост вплоть до 10 мкМ соединения 1. Эти результаты показывают, что действие соединения 1 на рост является целевым (фиг. 3).

Сравнение профиля чувствительности соединения 1 к профилям чувствительности к цитарабину и доксорубину.

Профиль чувствительности соединения 1 для подмножества гемовых колоний сравнивают с профилями чувствительности других агентов, которые используются в качестве стандарта медицинской помощи (СМП) при злокачественных новообразованиях гема. В соответствии со своим отличающимся механизмом действия, соединение 1 продемонстрировало профиль чувствительности (фиг. 4А), отличный от профилей чувствительности к цитарабину (фиг. 4В) и доксорубину (фиг. 4С).

Соединение 1 эффективно ингибирует ДГОДГ *in vivo* и блокирует рост опухоли в модели ксенотрансплантата ОМЛ.

Исследования *in vivo* эффективности соединения 1 проводят для оценки трансляции действия на блокаду ДГОДГ и ингибирование роста опухолевых клеток от *in vitro* до *in vivo*. 1×10^6 клетки MOLM-13 имплантируют подкожно мышам CB17 SCID. Мышей (n=15/группу) обрабатывают носителем или соединением 1 в дозе 100 мг/кг ДРС ПО как только опухоли достигают в среднем $\sim 150 \text{ мм}^3$. В конце исследования ткани собирают в указанные моменты времени после последней дозы для анализа фармакокинетики (ФК) и биомаркера пути.

Соединение 1, вводимое в дозе 100 мг/кг ДРС, хорошо переносится и дает практически полное ингибирование роста опухоли (ПРО) в модели ксенотрансплантата MOLM-13 острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) (фиг. 5А). Фармакокинетический профиль измеряют в плазме, и опухоль показывает падение концентраций лекарственного средства через 12 ч, поддерживая режим введения ДРС (фиг. 5В). Явным

свидетельством связывания с мишенью является значительное повышение уровней дигидрооротата (ДГО) в опухоли, субстрата ДГОДГ (фиг. 5C). Базовые уровни ДГО были ниже измеримого предела (BQL <120 нг/г). Уридиновые пулы в опухоли параллельно снижаются на ~60% в зависимости от оцениваемого момента времени (фиг. 5D).

Соединение 1 эффективно ингибирует ДГОДГ *in vivo* и блокирует рост опухоли в моделях ксенотрансплантата полученных у пациентов ОМЛ и ДДБККЛ.

Далее проводят скрининг с применением небольшого количества мышей в группе для оценки эффективности соединения 1 в моделях ксенотрансплантатов полученных у пациентов ОМЛ и ДДБККЛ. Мышей с опухолью (n=3/группе) обрабатывают носителем или соединением 1 в дозе 100 мг/кг ДРС ПО.

Как показано на фиг. 6A-E и 7A-B, противоопухолевое действие соединения 1 наблюдается во всех тестированных моделях, с >60% ПРО в двух из пяти моделях ОМЛ (i.e. ОМЛ_2 и ОМЛ_5) и одной из двух моделей ДДБККЛ (ДДБККЛ_1). Модель ДДБККЛ_1 характеризуется как трехударная модель ДДБККЛ.

In vitro ингибирование роста колоний человеческих раковых клеток двухударной диффузной В-клеточной лимфомы соединением 1

Было обнаружено, что три полученные у пациентов колонии клеток ДБККЛ лимфомы, классифицированные как двухударная ДДБККЛ, а именно OCILY18, SC-1 и CARNIVAL, являются высокочувствительными к ингибированию соединением 1 в 96-часовом анализе роста (фиг. 8).

Соединение 1 эффективно блокирует рост опухоли в модели ксенотрансплантата полученной у пациента ДДБККЛ.

Сильная блокировка *in vivo* роста опухоли наблюдается для соединения 1 в модели ксенотрансплантата OCILY-19 диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДДБККЛ). 7×10^6 клеток OCILY-19 имплантируют подкожно мышам CB17 SCID. Мышей (n=15-18/группу) обрабатывают носителем или соединением 1 в указанной дозе/частоте как только опухоли достигают в среднем ~150 мм³. Ткани собирают в указанные моменты времени после последней дозы для анализов ФК и биомаркера.

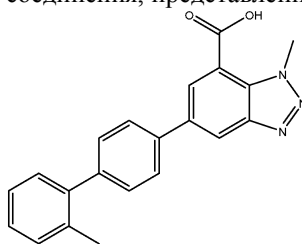
Степень модулирования пути и ингибирования роста опухоли продемонстрировала зависимость от дозы и схемы (фиг. 9A). Схема введения 100 мг/кг ДРС дает превосходную эффективность по сравнению с дозами 10 и 30 мг/кг ДРС, и это коррелирует со значительным увеличением ДГО в опухоли (фиг. 9C), а также со снижением общего количества уридиновых пулов в опухоли (фиг. 9D). Схема 200 мг/кг ОРС была менее эффективной, чем схема введения 100 мг/кг ДРС из-за короткого периода полувыведения соединения 1 у мышей, что дает более низкие минимальные концентрации препарата при введении ОРС (см. фиг. 9B).

In vitro ингибирование роста множества колоний клеток трижды негативного рака молочной железы соединением 1.

Панель колоний клеток трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) подвергают скринингу для оценки того, может ли быть лечение соединением 1 в качестве единственного агента благоприятным для подмножества ТНРМЖ. Лечение соединением 1 в течение 96 ч сильно ухудшает жизнеспособность/рост клеток в DU4475 до сравнимой степени, наблюдаемой в колониях клеток гемового происхождения (см. фиг. 10), хотя четыре другие колонии ТНРМЖ (HCC1143, HCC38, BTS49 и HCC1806) были не чувствительны в условиях тестирования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

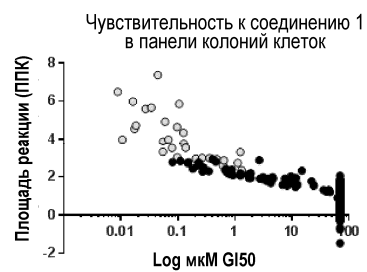
1. Способ лечения рака, выбранного из острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-пролимфоцитарного лейкоза, неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, анапластической крупноклеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, трижды негативного рака молочной железы, меланомы, рака простаты и рака пищевода у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, представленного следующей формулой:



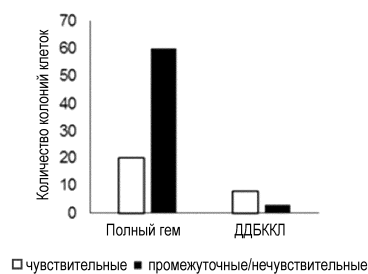
или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п.1, где раком является острый миелоидный лейкоз.
3. Способ по п.1, где раком является множественная миелома.
4. Способ по п.1, где раком является В-пролимфоцитарный лейкоз.
5. Способ по п.1, где раком является неходжкинская лимфома.
6. Способ по п.1, где раком является диффузная В-крупноклеточная лимфома.

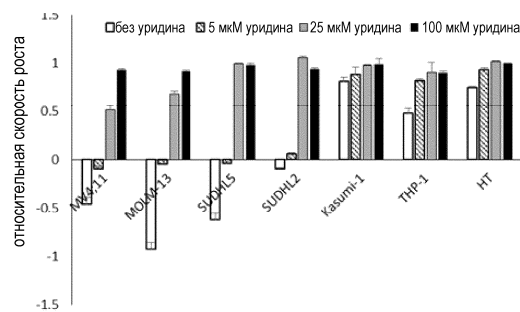
7. Способ по п.1, где раком является анапластическая крупноклеточная лимфома.
8. Способ по п.1, где раком является мантийноклеточная лимфома.
9. Способ по п.1, где раком является трижды негативный рак молочной железы.
10. Способ по п.1, где раком является меланома.
11. Способ по п.1, где раком является рак простаты.
12. Способ по п.1, где раком является рак пищевода.



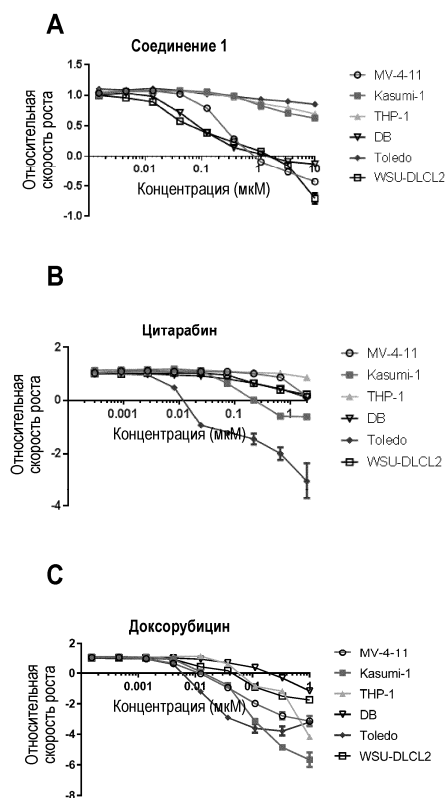
Фиг. 1



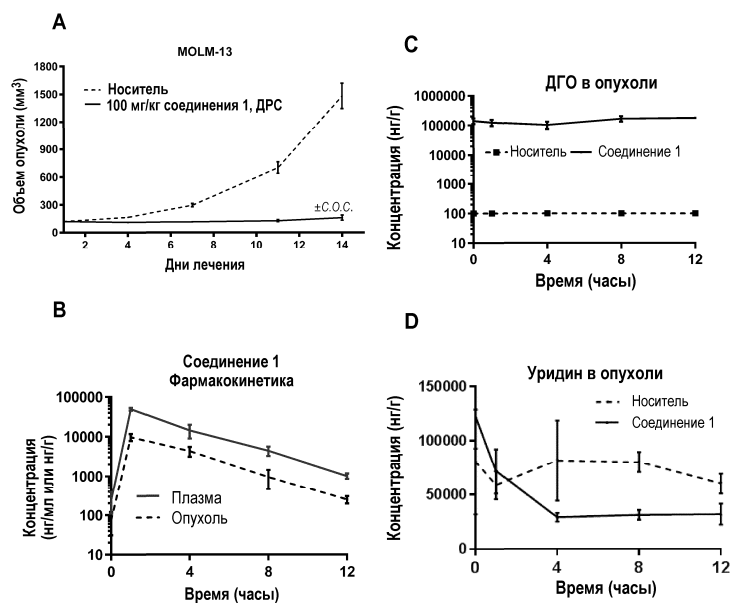
Фиг. 2



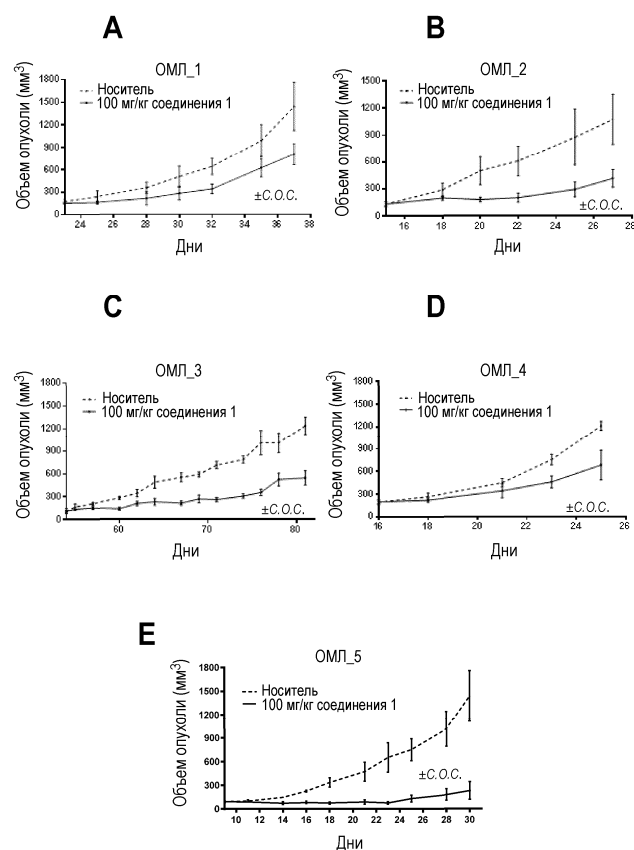
Фиг. 3



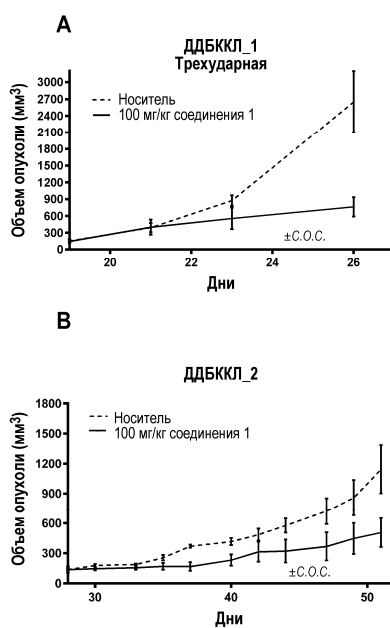
Фиг. 4



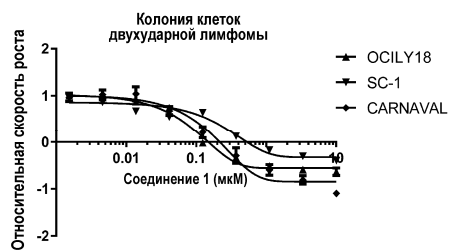
Фиг. 5



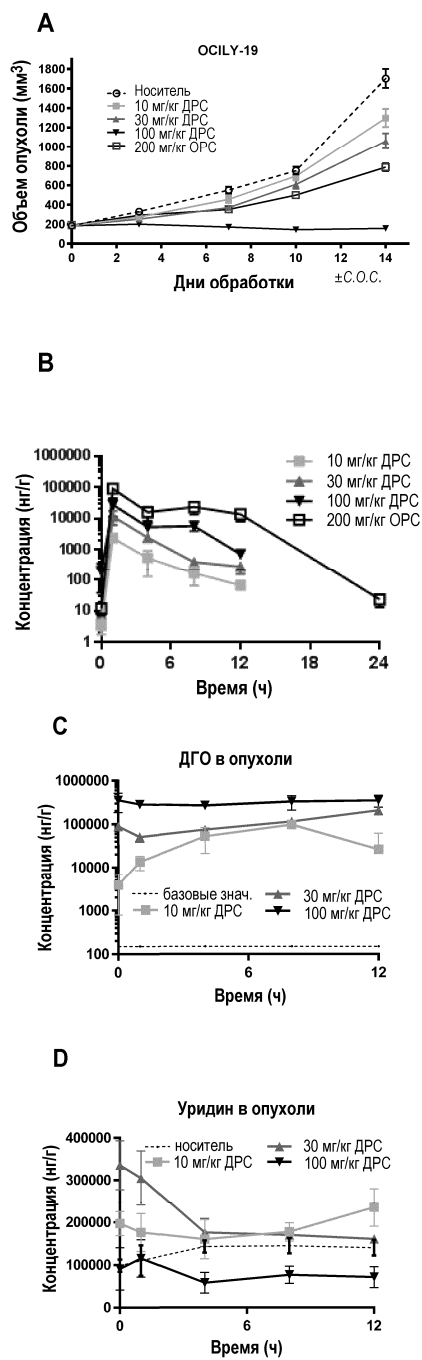
Фиг. 6



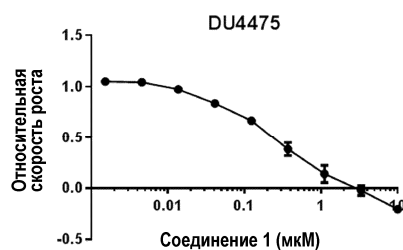
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

