

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034216**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.17

(21) Номер заявки
201690531

(22) Дата подачи заявки
2014.11.25

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ 1-(5-ТРЕТ-БУТИЛ-2-АРИЛПИРАЗОЛ-3-ИЛ)-3-[2-ФТОР-4-[(3-ОКСО-4Н-ПИРИДО[2,3-В]ПИРАЗИН-8-ИЛ)ОКСИ]ФЕНИЛ]МОЧЕВИНЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ RAF ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **1320729.5**

(32) **2013.11.25**

(33) **GB**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/GB2014/053490**

(87) **WO 2015/075483 2015.05.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КАНСЕР РЕСЕРЧ ТЕКНОЛОДЖИ
ЛИМИТЕД; ИНСТИТЮТ ОФ
КАНСЕР РИСЕРЧ: РОЙЯЛ КАНСЕР
ХОСПИТАЛ (ЗЕ) (GB)**

(72) Изобретатель:

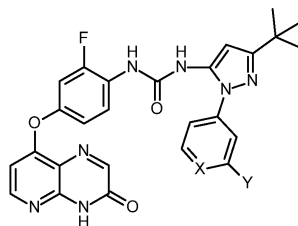
**Спрингер Кэролайн Джой, Мараис
Ричард, Джиротти Ромина,
Никулеску-Дувас Дэн, Никулеску-
Дувас Йон, Замбон Альфонсо (GB)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A1-2009077766**

(57) Изобретение относится, в целом, к области терапевтических соединений. Более конкретно, настоящее изобретение относится к определенным соединениям 1-(5-трет-бутил-2-арилпиразол-3-ил)-3-[2-фтор-4-[(3-оксо-4Н-пиридо[2,3-в]пиразин-8-ил)окси]фенил]мочевины (называемым в данном документе "соединения ТВАР"), которые, *inter alia*, ингибируют RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, и применению таких соединений и композиций как *in vitro*, так и *in vivo* для ингибирования RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.) и для лечения нарушений, включая пролиферативные нарушения; рак (в том числе, например, злокачественную меланому, рак ободочной и прямой кишки, аденокарциному поджелудочной железы); воспаление; иммунологические нарушения; вирусные инфекции; фиброзные нарушения; нарушения, ассоциированные с мутантной формой RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.); нарушения, облегчаемые ингибированием RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.); нарушения, облегчаемые ингибированием мутантного BRAF; нарушения, облегчаемые ингибированием BRAF и CRAF; нарушения, ассоциированные с мутациями RAS и/или с активацией пути MAPK; нарушения, облегчаемые ингибированием SRC, p38, FGFR, VEGFR-2 (KDR) и/или LCK и т.д.

**B1****034216****034216****B1**

Родственная заявка

Данная заявка связана с заявкой на патент Соединенного Королевства под номером 1320729.5, поданной 25 ноября 2013 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

Настоящее изобретение относится, в целом, к области терапевтических соединений. Более конкретно, настоящее изобретение относится к определенным соединениям 1-(5-трет-бутил-2-арилпиразол-3-ил)-3-[2-фтор-4-[(3-оксо-4Н-пиридо[2,3-*b*)]пиразин-8-ил)окси]фенил]мочевины (называемым в данном документе "соединения ТВАР"), которые, *inter alia*, ингибируют RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, и применению таких соединений и композиций как *in vitro*, так и *in vivo* для ингибирования RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.) и для лечения нарушений, включая пролиферативные нарушения; рак (в том числе, например, злокачественную меланому, рак ободочной и прямой кишки, аденокарциному поджелудочной железы); воспаление; иммунологические нарушения; вирусные инфекции; фиброзные нарушения; нарушения, ассоциированные с мутантной формой RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.); нарушения, облегчаемые ингибированием RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.); нарушения, облегчаемые ингибированием мутантного BRAF; нарушения, облегчаемые ингибированием BRAF и CRAF; нарушения, ассоциированные с мутациями RAS и/или с активацией пути MAPK; нарушения, облегчаемые ингибированием SRC, p38, FGFR, VEGFR-2 (KDR) и/или LCK и т.д.

Предпосылки создания изобретения

Ряд публикаций цитируется в данном документе для того, чтобы более полно описать и раскрыть настоящее изобретение и существующий уровень техники, к которому относится настоящее изобретение. Каждый из источников данного документа включен посредством ссылки во всей своей полноте в настоящее раскрытие в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка конкретно и индивидуально указывалась для включения посредством ссылки.

Во всем данном описании, включая формулу изобретения, которая следует ниже, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как подразумевающее включение указанных числа, или стадии, или группы чисел или этапов, но не исключение любых других числа, или стадии или группы чисел или стадий.

Необходимо отметить, что используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Следовательно, например, ссылка на "фармацевтический носитель" включает смеси из двух или более таких носителей и тому подобное.

Диапазоны часто выражаются в данном документе как от "приблизительно" одного конкретного значения и/или до "приблизительно" другого конкретного значения. Когда выражается такой диапазон, другой вариант осуществления включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения выражаются в виде приближений с применением условия "приблизительно", то следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант осуществления.

Данное раскрытие содержит информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Это не является признанием того, что любая информация, предоставленная в данном документе, является известным уровнем техники или имеет отношение к заявляемому настоящим изобретению или что любая публикация, на которую специально или неявно ссылаются, является известным уровнем техники.

RAF, пролиферативные нарушения и рак

Мутации в генах, которые прямо или косвенно контролируют рост и дифференцировку клеток, как правило, рассматриваются в качестве основной причины рака. Злокачественные опухоли развиваются посредством серии ступенчатых прогрессивных изменений, которые приводят к потере характеристик контроля роста раковых клеток, т.е. к непрерывной нерегулируемой пролиферации, способности к инвазии в окружающие ткани, способности к метастазированию в участки различных органов, стимуляции ангиогенеза, устойчивости к апоптозу, способности обходить иммунную систему, аномальным метаболическим путям и местному воспалению. Тщательно контролируемые исследования *in vitro* помогли определить факторы, которые характеризуют рост нормальных и опухолевых клеток, и привели к идентификации специфических белков, которые контролируют рост и дифференцировку клеток.

RAF является ключевой ниже расположенной мишенью для белков RAS, связывающих гуаниновый нуклеотид / GTPаз, и опосредует активацию каскада MAP-киназы, состоящего из RAF-MEK-ERK. Активированная ERK представляет собой киназу, которая в дальнейшем направлена на ряд белков, ответственных за опосредование, среди прочего, роста, выживания и транскрипционных функций данного пути. К их числу относятся транскрипционные факторы ELK1, C-JUN, семейство Ets (в том числе Ets 1, 2 и 7) и семейство FOS. Путь сигнальной трансдукции RAS-RAF-MEK-ERK активируется в ответ на множество клеточных стимулов, в том числе факторы роста, такие как EGF, PDGF, KGF и т.д. Поскольку путь является главной мишенью для действия факторов роста, было обнаружено, что активность RAF-MEK-

ERK подвергалась повышающей регуляции во многих зависимых от факторов роста опухолях. Наблюдение, что приблизительно 20% всех опухолей подверглись активирующей мутации в одном из белков RAS, указывает на то, что путь является в более широком смысле важным при онкогенезе.

Семейство онкогенов RAF включает три высоко консервативных гена, названных ARAF, BRAF и CRAF (также называемый Raf-1). Гены RAF кодируют протеинкиназы, которые, как полагают, играют важную регуляторную роль в процессах сигнальной трансдукции, которые регулируют пролиферацию клеток. Гены RAF кодируют высоко консервативные серин-треонин-специфические протеинкиназы, которые привлекаются в плазматическую мембрану после прямого связывания с RAS, что является инициирующим событием в активации RAF. Белки RAF являются частью пути сигнальной трансдукции, состоящего, как полагают, из рецепторных тирозинкиназ, p21 RAS, RAF, киназ Mek1 (активатор ERK или MAPKK) и киназ ERK (MAPK), которые в конечном счете фосфорилируют несколько клеточных субстратов, в том числе транскрипционные факторы. Передача сигнала через этот путь может опосредовать дифференцировку, пролиферацию или онкогенную трансформацию при различных ситуациях в клетке. Таким образом, RAF-киназы, как полагают, играют фундаментальную роль в нормальном клеточном пути сигнальной трансдукции, связывая множество факторов роста с их чистым эффектом, клеточной пролиферацией. Поскольку белки RAF представляют собой прямые ниже расположенные эффекторы белка RAS, методы лечения, направленные против RAF-киназ, являются, как полагают, полезными при лечении RAS-зависимых опухолей.

RAF-киназы дифференциально регулируются и экспрессируются. CRAF экспрессируется во всех органах и во всех клеточных линиях, которые были изучены. ARAF и BRAF также производят впечатляющие повсеместно распространенных, но наиболее высоко экспрессируются в урогенитальных тканях и тканях головного мозга, соответственно. Поскольку BRAF высоко экспрессируется в нервных тканях, сначала полагали, что он ограничен этими тканями, но с тех пор было обнаружено, что он экспрессируется более широко. Хотя все белки RAF могут связываться с активным RAS, BRAF наиболее сильно активируется онкогенным RAS.

BRAF является важным при раке, поскольку мутирован приблизительно в половине злокачественных меланом и случаев сосочкового рака щитовидной железы, в 30% случаев рака яичников низкой степени злокачественности, 15% случаев рака ободочной (толстой) кишки и с высокой частотой при злокачественном ретикулоэндотелиозе, а также встречается с меньшей частотой при ряде других форм рака, в общей сложности в 7% форм рака человека. См., например, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>. В специфическом подтипе рака поджелудочной железы, медуллярном раке поджелудочной железы с KRAS2 дикого типа мутации BRAF присутствуют в 30% образцов (см., например, Calhoun et al., 2003). В противоположность этому мутации ARAF и CRAF являются очень редкими при раке человека.

Таблица 1		
Частота мутаций BRAF при различных видах рака		
Тип опухоли	Частота	Ссылка
Злокачественная меланома	50%	
Сосочковый рак щитовидной железы (РТС)	45%	Xing, 2013
Обычный РТС	15%	
Фолликулярный вариант РТС	80-100%	
Крупноклеточный РТС	25%	
Анапластический рак щитовидной железы		
Рак ободочной и прямой кишки	15%	
Карциномы яичников низкой степени злокачественности	30%	
злокачественный ретикулоэндотелиоз	100%	Arcaini et al., 2012
Холангиокарцинома	15%	
Опухоли нервной системы	7%	Schindler et al., 2011
Пилоцитарная астроцитома	9%	
Ганглиogliома	18%	
Плеоморфная ксантоастроцитома	66%	
Множественная миелома	4%	Chapman et al., 2011
Немелкоклеточный рак легких	1-3%	
Медуллярный рак поджелудочной железы	30%	
Частота мутаций BRAF при других заболеваниях		
Гистиоцитоз		
Гистиоцитоз клеток Лангерганса	57%	Badalian-Very et al., 2011
Болезнь Эрдгейма-Честера	54%	Haroche et al., 2012

Более 100 различных мутаций было описано в BRAF при раке, но одна мутация (замещение глутаминовой кислотой (E) валина (V) в положении 600) составляет приблизительно 80% от общего числа мутаций BRAF при раке. Эта мутация повышает активность BRAF в 500 раз и дает ему возможность

стимулировать конститутивную передачу сигнала ERK и NFκB, стимулируя выживание и пролиферацию. В результате V^{600E} BRAF может трансформировать клетки, такие как фибробласты и меланоциты. Ингибирование V^{600E} BRAF в раковых клетках ингибирует пролиферацию клеток и индуцирует апоптоз *in vitro*; *in vivo* оно подавляет рост опухолевых клеток, с подтверждением V^{600E} BRAF как терапевтической мишени.

Другими мутациями V600 BRAF, идентифицированными в меланоме, являются V600K, V600D и V600R (см., например, Davies et al, 2002; Wan et al, 2004; Long et al, 2011; Rubinstein et al, 2010). Незначительную подгруппу меланом также идентифицировали с мутациями BRAF в положениях, отличных от 600. Эти мутанты по BRAF вне положения V600 не обязательно активируют работу BRAF-киназы напрямую, но требуют присутствия CRAF для трансактивации их передачи сигнала MAPK (см., например, Smalley et al, 2009). В таких случаях ингибирование активности RAF будет оставаться полезной целью при лечении рака.

Важно отметить, что было показано, что лекарственные средства, которые ингибируют мутантный BRAF, такие как вемурафениб (PLX4032, RG7204, зельбораф) (см., например, Flaherty et al., 2010) и дабрафениб (GSK-2118436) (см., например, Falchook et al., 2012), могут опосредовать внушительные ответы у пациентов, чьи опухоли экспрессируют онкогенный BRAF (рассматривается в Salama et al., 2013). В частности, вемурафениб показал многообещающие результаты на полученной с помощью мутантного BRAF меланоме (см., например, Chapman et al., 2011; Sosman et al., 2012). Он был одобрен в 2011 г. Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для лечения поздней стадии метастатической или неоперабельной меланомы с мутацией V600E BRAF и в 2012 г. Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) в качестве монотерапии для лечения взрослых пациентов с позитивной по любой мутации BRAF V600 неоперабельной или метастатической меланомой. Дабрафениб был одобрен FDA и EMA в 2013 г. по тем же показаниям.

Эти данные подтверждают мутантный BRAF в качестве терапевтической мишени при меланоме и потенциальной мишени при других формах рака и пролиферативных заболеваниях, когда мутирован BRAF. Эти и другие данные свидетельствуют, что ингибирование активности RAF (например, BRAF) будет полезным при лечении рака и что ингибирование активности RAF (например, BRAF) может быть особенно полезным при тех формах рака, которые содержат мутацию конститутивной активации BRAF.

Устойчивость к ингибиторам BRAF

Несмотря на наличие способности опосредовать существенные клинические ответы, большинство пациентов, получавших лечение вермурафенибом и дабрафенибом, в конечном итоге прогрессировали на лечении (см., например, Flaherty et al., 2010; Sosman et al., 2012) из-за приобретения устойчивости, которая может быть опосредована несколькими механизмами (см., например, Sullivan et al., 2011). Кроме того, приблизительно 30% пациентов имеют первичную устойчивость и не отвечают на терапию, несмотря на присутствие мутации BRAF (см., например, Chapman et al., 2011).

Мутации в KRAS (G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A, G13D) были предложены в качестве прогностических маркеров для идентификации опухолей, которые не восприимчивы к лечению ингибитором мутантного BRAF (см., например, Hatzivassiliou et al., 2011). Мутация Q16K NRAS придает устойчивость к ингибитору BRAF вемурафенибу (см., например, Nazarian et al., 2010). Аналогичным образом, устойчивость к лечению ингибитором BRAF дабрафенибом прогнозируется по мутациям Q16K и A146T белка NRAS (см., например, Greger et al., 2012). Активация RAS посредством мутаций приводит к увеличению димеризации RAF (образованию гетеродимера CRAF с белком BRAF и/или гомодимера CRAF/BRAF) с увеличенной передачей сигнала через каскад MAPK и увеличенной пролиферацией клеток (см., например, Poulikakos et al. 2010).

Повышающая регуляция (и мутации в) CRAF представляет собой еще один механизм устойчивости, наблюдаемой в устойчивых меланоме с лечением ингибиторами BRAF (см., например, Heidorn et al., 2010; Montagut et al., 2008; Antony et al. 2013). Поэтому ингибиторы RAF для нескольких изоформ RAF (особенно BRAF и CRAF), вероятно, будут иметь повышенный эффект в RAS-мутировавших меланоме и других RAS-мутировавших формах рака и в целях решения одного из ключевых механизмов устойчивости к селективным ингибиторам BRAF.

Увеличение количества копий гена BRAFV600E связано с устойчивостью к ингибитору BRAF при BRAF-мутантной меланоме (см., например, Shi et al., 2012) и раке ободочной и прямой кишки (см., например, Corcoran et al., 2010). Обе эти модели являются чувствительными к одновременному ингибированию BRAF и MEK, но только усиленная BRAF-мутантная меланома является чувствительной к одному ингибитору MEK. Этот механизм устойчивости, вероятно будет более чувствительным к общему ингибированию RAF, чем к ингибированию только BRAF.

В некоторых меланоме устойчивость к вемурафенибу была приобретена в результате экспрессии сплайс-вариантов изоформ BRAFV600E. Сплайс-вариант BRAFV600E (p61BRAFV600E) 61 кДа лишен экзонов 4-8, кодирующего домен связывания RAS, и был устойчивым к вемурафенибу. p61BRAFV600E конститутивно димеризуется в отсутствие активированного RAS. Было показано, что димеризация p61BRAFV600E является критической для опосредования устойчивости к ингибитору BRAF (см., например, Poulikakos et al., 2011).

Слияние генов BRAF и CRAF представляет собой альтернативный механизм активации пути MAPK. Эти активирующие продукты слияния генов были идентифицированы при раке предстательной железы, раке желудка и меланоме (SLC45A3-BRAF и ESRP1-RAF1) (см., например, Palanisamy et al., 2010), при формах рака щитовидной железы (AKAP9-BRAF) (см., например, Ciampi et al., 2005) и при астроцитомах у детей (KIAA1549-BRAF) (см., например, Sievert et al., 2013). Некоторые из моделей, экспрессирующих слияния RAF (например, SLC45A3-BRAF), являются чувствительными к ингибированию BRAF и MEK; в отличие от этого модель KIAA1549-BRAF является устойчивой к PLX4720, но чувствительной к ингибитору BRAF второго поколения.

Супрессор киназы Ras (KSR) представляет собой консервативный позитивный модулятор пути RAS-RAF-MEK-ERK. KSR1 конститутивно взаимодействует с MEK и, как известно, играет важную роль в совместной локализации MEK и RAF в плазматической мембране. KSR1 вовлечен в активацию пути MAPK ингибиторами BRAF в RAS-мутантных или RAS-активированных клетках (см., например, McKay et al., 2011). Было предложено два механизма активации данного пути лекарственными средствами. Один из механизмов включает формирование димера CRAF-KSR1, образование комплекса с MEK и фосфорилирование MEK с помощью димера KSR1-CRAF (см., например, Hu et al., 2011). В другом механизме KSR1 димеризуется с BRAF и конкурирует с гетеродимером BRAF-CRAF, который управляет фосфорилированием MEK. Это свидетельствовало о том, что RAS-активированные клетки с более низкой экспрессией KSR1 покажут более парадоксальную активацию пути (см., например, McKay et al., 2011). При обоих механизмах общие ингибиторы RAF смогут снизить активацию пути независимо от уровня экспрессии KSR1.

Сверхэкспрессия рецепторных тирозинкиназ (RTK) представляет собой еще один механизм устойчивости к ингибиторам BRAF. Сверхэкспрессия EGFR (рецептора эпидермального фактора роста) ведет к опосредованной EGFR реактивации пути MAPK и устойчивости к вемурафенибу при формах BRAF-мутантного рака ободочной и прямой кишки (см., например, Corcoran et al., 2012). В устойчивых к лекарственным средствам клеточных линиях BRAF-мутантной меланомы передача сигнала EGFR-SFK-STAT3 может опосредовать устойчивость к ингибиторам BRAF *in vitro* и *in vivo* в меланоме (см., например, Girotti et al., 2013). Киназы семейства Src, SFK, играют ключевую роль в опосредовании устойчивости к ингибиторам BRAF в клетках меланомы (см., например, Girotti et al., 2013; Vergani et al., 2011). Повышенное фосфорилирование таких SFK, как LYN, YES и FYN, наблюдается в устойчивых к вемурафенибу линиях. Рост устойчивых клеток является чувствительным к ингибированию SFK: как дазатиниб, так и истощение SRC и LYN подавляют инвазию устойчивых клеток *in vitro*. Чрезвычайно важно, что передача сигнала SFK была повышена в опухоли пациента с естественной устойчивостью к вемурафенибу, и дазатиниб ингибировал рост и метастазирование данной опухоли у мышей.

Corcoran et al., 2012, "EGFR-mediated reactivation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF-mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib", *Cancer Discovery*, vol. 2, pp. 227-235.

Было обнаружено, что PDGFR- β сверхэкспрессируется и гиперфосфорилируется в мутантных по BRAF клеточных линиях, устойчивых к вемурафенибу, и активируется в определенных случаях устойчивых к вемурафенибу опухолей от пациентов, свидетельствуя, что этот механизм может быть клинически значимым (см., например, Nazarian et al., 2010).

Повышающая регуляция PDGFR- β может вызывать устойчивость путем активации других ERK1/2-независимых нижележащих путей (PI3K, PLC γ).

Механистические исследования показали, что передача сигнала IGFR1 опосредует повышенную передачу сигнала PI3K/AKT в клетках, которые приобрели устойчивость к ингибиторам BRAF, и что эта устойчивость может быть обратима путем обработки клеток комбинацией ингибитора PI3K и MEK или ингибитора IGF1R и MEK (см., например, Villanueva et al., 2011). Трансляционная релевантность этой находки была подтверждена наблюдением, что в 1 из 5 образцов меланомы от пациентов, нечувствительных к вемурафенибу, экспрессируются повышенные уровни IGFR1 (см., например, Villanueva et al., 2011).

Повышающая регуляция факторов роста в строме представляет собой один из механизмов устойчивости. Была показана значительная корреляция между экспрессией HGF в стромальных клетках пациентов с BRAF-мутантной меланомой и естественной устойчивостью к лечению ингибитором RAF (см., например, Wilson et al., 2012). cMET и/или их лиганды заявляются в качестве прогностических маркеров для идентификации опухолей, которые не чувствительны к ингибитору BRAF (см., например, Hatzivasiliou et al., 2011; Straussman et al., 2012). Двойное ингибирование RAF и либо HGF, либо MET приводит к отмене устойчивости к лекарственному средству, предлагая комбинированную терапию ингибиторами RAF плюс HGF или MET в качестве потенциальной терапевтической стратегии (см., например, Hatzivasiliou et al., 2011; Straussman et al., 2012).

FGFR1 участвует в прогрессировании меланомы, и нокдаун FGFR1 приводит к ингибированию роста меланомы *in vivo* (см., например, Wang et al., 1997). Фактор роста фибробластов (FGF) спасает некоторые мутантные по BRAF клетки от лечения PLX4032 (см., например, Wilson et al., 2012), и ингибирование FGFR1 является синергичным ингибитором мультикиназы/BRAF сорафенибу и специфическому ин-

гибитору BRAF, RG7204 (см., например, Metzner et al., 2012). Эти данные свидетельствуют, что ингибирование RTK, таких как EGFR, PDGFR- β , HGFR, IGF1R и FGFR, а также SFK, должно быть направлено на ряд механизмов устойчивости к селективным ингибиторам BRAF и, следовательно, будет полезным при мутантных по BRAF опухолях, которые становятся устойчивыми к BRAF-селективным ингибиторам.

Рак и RAS

Белки RAS являются небольшими связывающими гуаниновый нуклеотид белками, которые находятся ниже рецепторов факторов роста, цитокинов и гормонов. Эти рецепторы клеточной поверхности активируют белки, называемые факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (GNEF), которые замещают GDP на GTP в белках RAS, стимулируя активацию RAS. Другие белки, называемые GTPasa-активирующие белки (GAP), стимулируют естественную ОТРАЗную активность RAS, способствуя тем самым гидролизу GTP и возвращению RAS в его неактивное GDP-связанное состояние. Активированный RAS связывается с несколькими эффекторными белками, в том числе с фосфоинозитид-3-киназой (PI3K), протеинкиназами семейства RAF и фактором обмена гуаниновых нуклеотидов Ral. Эти эффекторы, в свою очередь, регулируют активность сигнальных путей, которые контролируют пролиферацию клеток, старение, выживание и дифференцировку. Существует три гена RAS у млекопитающих, называемые HRAS, KRAS и NRAS, и они обслуживают перекрывающиеся, но не консервативные функции.

Белки RAS также важны при раке. 20-30% опухолей человека содержат соматические мутации усиления функции в одном из генов RAS. Чаще всего они затрагивают кодоны для глицина 12 (G12), глицина 13 (G13) и глутамина 61 (Q61), и эти мутации нарушают с помощью различных механизмов GAP-стимулированную естественную ОТРАЗную активность RAS, удерживая его в активном GTP-связанном состоянии и позволяя ему стимулировать онкогенез. См., например, Downward et al., 2003; Young et al., 2009; Bos et al., 1989.

Тип опухоли	Частота	Ссылка
Поджелудочной железы	90%	
Щитовидной железы (недифференцированный сосочковый)	60%	
Щитовидной железы (фолликулярный)	55%	
Ободочной и прямой кишки	45%	
Семинома	45%	
Аденокарцинома легких (немелкоклеточная)	35%	
Печени	30%	
Гематологические злокачественные опухоли:		Ward <i>et al.</i> , 2012
Острый миелобластный лейкоз (AML)	16%	
Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (JMML)	25%	
Хронический миеломоноцитарный лейкоз (JMML)	30%	
Миелодиспластический синдром (MDS)	6%	
Острый лимфобластный лейкоз (ALL)	14%	
Множественная миелома (MM)	26%	
Лимфома Беркита	10%	
Лимфома Ходжкина	16%	
Злокачественная меланома	20%	
Переходно-клеточный рак мочевого пузыря	12%	Fernandes-Medarde, 2011
Почки	10%	

Тип опухоли	Частота	Ссылка
Формы эпителиального рака яичников	11%	www.mycancergenome.org
Низкой степени злокачественности		
серозный (тип I)	33%	
Слизеобразующий (тип I)	50-75%	
Формы рака эндометрия	0-46%	Mammas <i>et al.</i> , 2005
Рак шейки матки	0-61%	Mammas <i>et al.</i> , 2005
Аденокарцинома желчных протоков	35%	Fernandes-Medarde, 2011
Саркома мягких тканей*		Fernandes-Medarde, 2011
Ангиосаркома	49%	
Лейомиосаркома	8%	
Раβδοмиосаркома	11%	
Миксома	11%	
Злокачественная фиброзная гистиоцитома	16%	

(*) Наиболее часто цитируется мутировавший RAS (KRAS, или NRAS, или HRAS).

Другие формы рака имеют меньшую частоту мутаций генов семейства RAS, но их мутации являются предиктивными для прогноза, например, нейробластомы (8% мутации NRAS), аденокарциномы желудка (6% мутантов KRAS).

RAS и RAF

Активные белки RAS активируют несколько нижележащих эффекторов, в том числе белки семейства RAF. Есть три белка RAF: ARAF, BRAF и CRAF. Активированный RAF фосфорилирует и активирует вторую протеинкиназу, называемую MEK, которая затем фосфорилирует и активирует третью протеинкиназу, называемую ERK. ERK фосфорилирует множество цитозольных и ядерных субстратов, тем самым регулируя клеточные процессы, такие как пролиферация, выживание, дифференцировка и старение.

Примечательно, однако, что в раковых клетках онкогенный RAS не передает сигнал через BRAF, а вместо этого передает сигнал исключительно через CRAF для активации MEK.

В подавляющем большинстве форм рака мутации BRAF и RAS являются взаимоисключающими. Это обеспечивает генетические доказательства для предположения о том, что данные белки находятся на одном и том же пути и что они управляют одними и теми же процессами в раковых клетках. Однако есть четкое различие между онкогенными функциями BRAF и RAS в раковых клетках. Во-первых, RAS активирует несколько путей, тогда как для BRAF известно лишь об активации пути MEK/ERK. Как следствие, мутантные по BRAF клетки являются более зависимыми от передачи сигнала MEK/ERK и поэтому значительно более чувствительны к ингибиторам BRAF или MEK, чем клетки, в которых мутирован RAS. См., например, Garnett *et al.*, 2004; Wellbrock *et al.*, 2004; Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Solit *et al.*, 2006.

Помимо мутаций сигнальные белки в каскаде MAPK сверхэкспрессируются в ряде злокачественных опухолей. Например, HRAS и NRAS сверхэкспрессируются при формах рака шейки матки. Мутации RAS являются редкими при аденокарциноме, но совокупная популяция опухолей с мутациями в RAS, BRAF и EGFR демонстрирует повышенную передачу сигнала через этот путь и может быть мишенью для ингибиторов пути MAPK (см., например, Koutoula *et al.*, 2009). Формы рака яичников низкой степени злокачественности и перитонеальный рак отвечают на блокаду пути MAPK ингибитором MEK селуметинибом независимо от статуса мутации RAS/RAF. В увеальной меланоме путь MAPK активируется посредством мутации GNAQ, на долю которой приходится 50% форм увеальной меланомы (см., например, Gaudi *et al.*, 2011). CRAF сверхэкспрессируется при разновидностях первичного рака человека, таких как опухоли легких, печени, предстательной железы, примитивные нейродермальные опухоли, плоскоклеточный рак головы и шеи (см., например, Damodar Reddy *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2004; Mukterjee *et al.*, 2005; Schreck *et al.*, 2006; Riva *et al.*, 1995). Путь MAPK активирован в 74% образцов пациентов с острым миелоидным лейкозом (см., например, Milella *et al.*, 2001). При нейрофиброматозе 1 типа потеря гена опухолевого супрессора NF1 приводит к гиперактивированной передаче сигналов RAS и deregулированной передаче сигналов Ras/ERK, что имеет решающее значение для роста NF1-опухолей периферических нервов (см., например, Jessen *et al.*, 2013). Общий ингибитор RAF вызывает эффективную блокаду пути MAPK в мутантных по BRAF опухолях и в мутантных по RAS опухолях и имеет широкое применение при формах рака с deregулированием сигнального пути MAPK.

Формы рака с активирующими мутациями RAS, RAF и EGFR или сверхэкспрессией RAS, RAF и EGFR, в том числе любой из их изоформ, могут, следовательно, быть особенно чувствительными к общему ингибированию RAF (например, CRAF и BRAF). Формы рака с другими аномалиями, ведущими к повышенной активности сигнала пути RAF-MEK-ERK, также могут быть особенно чувствительными к лечению общими ингибиторами активности RAF (например, CRAF и BRAF). Примеры таких аномалий включают конститутивную активацию рецептора фактора роста; сверхэкспрессию одного или несколь-

ких рецепторов фактора роста; сверхэкспрессию одного или нескольких факторов роста; активацию опосредованного KSR пути и слияние генов BRAF или CRAF.

Путь MAPK при других заболеваниях

Путь RAF-MEK-ERK функционирует ниже многих рецепторов и стимулов, что указывает на широкую роль в регуляции функции клеток. По этой причине ингибиторы RAF могут найти применение при других болезненных состояниях, которые связаны с повышающей регуляцией передачи сигналов через этот путь. Путь RAF-MEK-ERK также представляет собой важный компонент нормального ответа не-трансформированных клеток на действие факторов роста. Следовательно, ингибиторы RAF могут быть полезны при заболеваниях, где присутствует несоответствующая или избыточная пролиферация нормальных тканей. Они включают, например, гломерулонефрит и псориаз.

Работа воспалительных клеток контролируется многими факторами, эффекты которых опосредованы различными путями сигнальной трансдукции. Хотя некоторые ключевые провоспалительные функции опосредованы Мар-киназой p38 (например, высвобождение TNF), другие опосредованы другими путями. Путь RAF-MEK-ERK, в частности, представляет собой важный активирующий и пролиферативный сигнал во многих воспалительных клетках. В- и Т-лимфоциты, в частности, требуют активации пути RAF-MEK-ERK для клональной экспансии и создания эффекторных популяций (см., например, Cantrell, 2003; Genot et al., 2000). Клеточный путь передачи сигналов, частью которого является RAF, участвует в воспалительных нарушениях, характеризующихся пролиферацией Т-клеток (активацией и ростом Т-клеток), таких как отторжение тканевого трансплантата, эндотоксический шок и гломерулярный нефрит.

Активация передачи сигналов MAPK/ERK была показана на многих моделях заболеваний, и ингибирование этого пути с помощью, например, ингибиторов MEK, было показано как потенциально полезное при следующих различных заболеваниях.

Боль. Доказательство эффективности на моделях боли: путь MEK активируется в нейронах заднего рога при постоянной боли (см., например, Ji et al., 2002; Song et al., 2005; Ma et al., 2005; Karim et al., 2006); ингибиторы Mek при нейропатической боли (см., например, Dixon et al., 2001).

Инсульт. Доказательство эффективности на моделях инсульта: значительная нейропротекция против ишемических повреждений головного мозга ингибиторами MEK (см., например, Wang et al., 2003; Wang et al., 2004; Maddahi et al., 2010).

Диабет. Доказательства при диабетических осложнениях (см., например, Fujita et al., 2004).

Воспаление. Доказательство эффективности на моделях воспаления (см., например, Jaffee et al., 2000; Thalhamer et al., 2008; Geppert et al., 1994).

Артрит. Доказательство эффективности при экспериментальном остеоартрите (см., например, Pelletier et al., 2003); модель ревматоидного артрита (см., например, Chun et al., 2002; Dudley et al., 2000); рассматривается в Thalhamer et al., 2008.

Ремоделирование сердца, например, при метаболическом синдроме (см., например, Asrih et al., 2013).

Повреждение органов, например, при цисплатин-индуцированном повреждении почек (см., например, Jo et al., 2005).

Формы гемоглобинопатии: серповидно-клеточная анемия, (3-талассемия, H-гемоглобинопатия (см., например, Zennadi et al., 2012).

Астма (см., например, Bridges et al., 2000).

Отторжение трансплантата (см., например, Gilbertsen et al., 2000).

Септический шок (см., например, Geppert et al., 1994).

Вирусная инфекция, например гепатит В (см., например, Benn et al., 1994), гепатит С (см., например, Zhang et al., 2012), вирус иммунодефицита человека (HIV) (см., например, Yang et al., 1999), вирус Эпштейна-Барр (EBV) (см., например, Fukuda et al., 2007), HPV (см., например, Payne et al., 2001), вирус герпеса-8 человека (HHV), ассоциированный с саркомой Капоши (см., например, Akula et al., 2004), цитомегаловирус человека (см., например, Johnson et al., 2001), вирус Коксаки В3 (см., например, Luo et al., 2002), вирус Борна (см., например, Planz et al., 2001), вирус гриппа (см., например, Pleschka et al., 2001).

Хронические инфекционные и аутоиммунные заболевания, например, с ингибированием регуляторной активности Т-клеток (см., например, Kjetil et al., 2013).

Атеросклероз (см., например, Miura et al., 2004).

Рестеноз (см., например, Graf et al., 1997).

Кардиомиопатия (см., например, Lorenz et al., 2009).

Повреждение сердца при ишемии-реперфузии (см., например, Zouki et al., 2000).

Псориаз (см., например, Haase et al., 2001).

Болезнь Альцгеймера (см., например, Mei et al., 2006) и другие индуцированные неврологические нарушения, такие как HTLV-I-ассоциированная миелопатия/тропические спастические паразитарные или нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона или боковой амилоидный склероз, посредством модулирования сплайс-вариантов CD44 (см., например, Pinner et al., 2009).

Хроническая обструктивная болезнь легких (см., например, Mercer et al., 2006).

Воспалительное заболевание кишечника (см., например, Lowenberg et al., 2005).

Фиброгенные заболевания, такие как муковисцидоз (см., например, Li et al., 1998), фиброз печени, например, цирроз печени (см., например, Davies et al., 1996).

Наследственные мутации RAS, ведущие к группе заболеваний, коллективно называемых RASопатиями (RASopathies). Нацеливание на путь MAPK при этих заболеваниях было предложено в качестве терапевтического подхода при таких типах заболеваний, как синдром Нунан (см., например, Gu et al., 2013), кардиофациокожный синдром (см., например, Anastasaki et al., 2012) и пороки развития капилляров (см., например, Vikkula et al., 2004).

RTK

Рецепторные тирозинкиназы (RTK) играют важную роль в передаче биохимических сигналов через плазматическую мембрану клеток. Эти трансмембранные молекулы типично состоят из внеклеточного лиганд-связывающего домена, соединенного через сегмент в плазматической мембране с внутриклеточным доменом тирозинкиназы. Связывание лиганда с рецептором приводит к стимуляции рецептор-ассоциированной тирозинкиназной активности, что ведет к фосфорилированию тирозиновых остатков как на рецепторе, так и на других внеклеточных белках, приводя к различным клеточным ответам. На сегодняшний день идентифицировано по меньшей мере девятнадцать различных подсемейств RTK, определенных по гомологии аминокислотной последовательности.

FGFR

Семейство факторов роста фибробластов (FGF) - сигнальные полипептиды, которые регулируют широкий спектр физиологических функций, включая митогенез, заживление ран, дифференцировку клеток, ангиогенез и развитие. На клеточный рост и пролиферацию как нормальных, так и злокачественных клеток влияют изменения локальной концентрации этих внеклеточных сигнальных молекул, которые действуют в качестве аутокринных, а также паракринных факторов. Аутокринная передача сигналов FGF может быть особенно важной при прогрессировании зависимых от стероидных гормонов форм рака и для гормоннезависимого состояния (см., например, Powers et al., 2000).

FGF и их рецепторы экспрессируются на повышенных уровнях в некоторых тканях и клеточных линиях, и сверхэкспрессия, как полагают, способствует злокачественному фенотипу. Кроме того, ряд онкогенов является гомологами генов, кодирующих рецепторы факторов роста, и есть потенциал для аномальной активации FGF-зависимой передачи сигналов при раке поджелудочной железы человека (см., например, Ozawa et al., 2001).

Два прототипичных члена представляют собой кислый фактор роста фибробластов (aFGF или FGF1) и основной фактор роста фибробластов (bFGF или FGF2), и на сегодняшний день было идентифицировано по меньшей мере двадцать различных членов семейства FGF. Клеточный ответ на FGF передается через четыре типа высокоаффинных трансмембранных тирозинкиназных рецепторов фактора роста фибробластов, пронумерованных с 1 по 4 (с FGFR-1 до FGFR-4). После связывания лиганда рецепторы димеризуются и авто- или транс-фосфорилируют специфические цитоплазматические остатки тирозина для передачи внутриклеточного сигнала, который в конечном счете достигает эффекторов ядерных транскрипционных факторов.

Нарушение пути FGFR-1 (FGFRA) должно влиять на пролиферацию опухолевых клеток, поскольку эта киназа активируется во многих типах опухолей в дополнение к пролиферирующим эндотелиальным клеткам. Сверхэкспрессия и активация FGFR-1 в связанной с опухолью сосудистой сети свидетельствует о роли этих молекул в опухолевом ангиогенезе.

FGFR-2 имеет высокое сродство к кислым и/или основным факторам роста фибробластов, а также к лигандам фактора роста кератиноцитов. FGFR-2 также передает мощные остеогенные эффекты FGF в процессе роста и дифференцировки остеобластов. Мутации в FGFR-2, ведущие к комплексным функциональным изменениям, как было показано, вызывают аномальное окостенение черепных швов (краниосинозоз), свидетельствуя о главной роли передачи сигналов FGFR при внутримембранном образовании кости. Например, синдром Апера (AP), характеризующийся преждевременным окостенением черепных швов, ассоциирован в большинстве случаев с точечными мутациями, вызывающими усиление функции FGFR-2 (см., например, Lemonnier et al., 2001).

Lemonnier et al., 2001, "Role of N-cadherin and protein kinase C in osteoblast gene activation induced by the S252W fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Apert craniosynostosis", J. Bone Miner. Res., vol. 16, pp. 832-845.

Несколько тяжелых нарушений развития скелета человека, в том числе синдромы Апера, Крузона, Джексона-Вейсса, Бир-Стивенсона со складчатой пахидермией и Пфайфера, связаны с возникновением мутаций в FGFR2. Большинство, если не все случаи синдрома Пфайфера (PS) также вызваны мутацией de novo гена FGFR-2 (см., например, Meyers et al., 1996; Plomp et al., 1998), и недавно было показано, что мутации в FGFR-2 нарушают одно из кардинальных правил регуляции специфичности по отношению к лигандам. В частности, две мутантные сплайс-формы рецептора фактора роста фибробластов, FGFR2c и FGFR2b получили способность связываться с атипичными лигандами FGF и активироваться ими. Эта потеря специфичности по отношению к лиганду приводит к аномальной передаче сигналов и свидетельствует о том, что тяжелые фенотипы данных болезненных синдромов являются результатом эктопической лиганд-зависимой активации FGFR-2 (см., например, Yu et al., 2000).

Активирующие мутации рецепторной тирозинкиназы FGFR-3, такие как хромосомные транслокации или точечные мутации, производят дерегулируемые конститутивно активные рецепторы FGFR-3, которые были вовлечены во множественную миелому и формы рака мочевого пузыря и шейки матки (см., например, Powers et al., 2000). Следовательно, ингибирование FGFR-3 будет полезным при лечении множественной миеломы, рака мочевого пузыря и шейки матки.

Ангиогенез

Хронические пролиферативные заболевания часто сопровождаются усиленным ангиогенезом, который может способствовать или поддерживать воспалительное и/или пролиферативное состояние, или который приводит к разрушению ткани посредством инвазивной пролиферации кровеносных сосудов (См., например, Folkman, 1995; Folkman, 1997; Folkman et al., 1992).

Ангиогенез обычно используется для описания развития новых или замещенных кровеносных сосудов или неоваскуляризации. Он является необходимым и физиологически нормальным процессом, с помощью которого сосудистая сеть создается в зародыше. Ангиогенез не происходит, в целом, в большинстве нормальных взрослых тканей, исключение составляют участки овуляции, менструации и заживления ран. Многие заболевания, однако, характеризуются постоянным и нерегулируемым ангиогенезом. Например, при артрите новые капиллярные кровеносные сосуды проникают в сустав и разрушают хрящ (см., например, Colville-Nash and Scott, 1992). При сахарном диабете (и при многих различных заболеваниях глаз) новые сосуды проникают в желтое пятно или сетчатку глаза или другие глазные структуры и могут привести к слепоте (см., например, Alon et al., 1995). Процесс атеросклероза связан с ангиогенезом (см., например, Kahlon et al., 1992). Было обнаружено, что опухолевый рост и метастазирование являются ангиогенез-зависимыми (см., например, Folkman, 1992; Denekamp, 1993; Fidler and Ellis, 1994).

Признание участия ангиогенеза в основных заболеваниях сопровождается исследованиями с целью выявления и разработки ингибиторов ангиогенеза. Эти ингибиторы, как правило, классифицируются в ответ на отдельные мишени в каскаде ангиогенеза, такие как активация эндотелиальных клеток с помощью ангиогенного сигнала; синтез и высвобождение деструктивных ферментов; миграция эндотелиальных клеток; пролиферация эндотелиальных клеток и формирование капиллярных трубочек. Таким образом, ангиогенез проходит множество стадий, и продолжаются попытки открыть и разработать соединения, которые работают для блокировки ангиогенеза на данных различных стадиях.

Существует множество публикаций, которые сообщают, что ингибиторы ангиогенеза, работающие через различные механизмы, являются полезными при таких заболеваниях, как рак и метастазирование (см., например, O'Reilly et al., 1994; Ingber et al., 1990), глазные болезни (см., например, Friedlander et al., 1995), артрит (см., например, Peacock et al., 1992; Peacock et al., 1995) и гемангиома (см., например, Tarabozetti et al., 1995).

VEGFR

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), полипептид, который является митогенным для эндотелиальных клеток *in vitro* и стимулирует ангиогенные ответы *in vivo*. VEGF также был связан к несоответствующим ангиогенезом (см., например, Pinedo et al., 2000). VEGFR представляют собой рецепторные тирозинкиназы (RTK). RTK катализируют фосфорилирование специфических тирозиновых остатков в белках, вовлеченных в регуляцию клеточного роста и дифференцировки (см., например, Wilks et al., 1990; Courtneidge et al., 1993; Cooper et al., 1994; Paulson et al., 1995; Chan et al., 1996).

Было идентифицировано три RTK-рецептора для VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1 или KDR) и VEGFR-3 (Flt-4). Эти рецепторы вовлечены в ангиогенез и участвуют в сигнальной трансдукции (см., например, Mustonen et al., 1995).

Особый интерес представляет VEGFR-2 (KDR), который является транс-мембранным рецептором RTK, экспрессируемым, главным образом, в эндотелиальных клетках. Активация VEGFR-2 с помощью VEGF представляет собой критический этап пути сигнальной трансдукции, который инициирует опухолевый ангиогенез. Экспрессия VEGF может быть конститутивной для опухолевых клеток и может также подвергаться повышающей регуляции в ответ на определенные стимулы. Одним из таких стимулов является гипоксия, когда экспрессия VEGF активируется как в опухолевых, так и в ассоциированных тканях хозяина. VEGF-лиганд активирует VEGFR-2 путем связывания с его внеклеточным сайтом связывания VEGF. Это ведет к рецепторной димеризации VEGFR и аутофосфорилированию тирозиновых остатков на внутриклеточном киназном домене VEGFR-2. Киназный домен работает с переносом фосфата от АТФ на тирозиновые остатки, обеспечивая таким образом сайты связывания для сигнальных белков ниже VEGFR-2, ведущих в конечном итоге к инициации ангиогенеза (см., например, McMahon et al., 2000).

Ингибирование сайта связывания в киназном домене VEGFR-2 будет блокировать фосфорилирование тирозиновых остатков и служить для нарушения инициации ангиогенеза.

VEGFR-2 (и VEGFR-3) локализованы, главным образом, в сосудистой сети (кровеносной и/или лимфатической) опухоли, поддерживающей большинство форм солидного рака, и поддаются существенной повышающей регуляции. Есть основания полагать, что основной клинический механизм действия ингибиторов передачи сигналов VEGF основан на нацеливании на сосуды опухоли, а не на опухолевые клетки (см., например, Smith et al., 2010), хотя были описаны и другие механизмы. Было показано, что средства, направленные на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), вводимые либо как отдельные сред-

ства, либо в комбинации с химиотерапией, приносят пользу пациентам со злокачественными опухолями на поздних стадиях (см., например, Ellis et al., 2008).

KDR играет решающую роль при других заболеваниях, и ингибиторы KDR могут найти применение в этих условиях.

Атеросклероз

KDR выраженно экспрессируется как на эндотелиальных клетках в процессе ангиогенеза, так и на эндотелии просвета атеросклеротических сосудов человека, но не в нормальных артериях или венах (см., например, Belgore et al., 2004). Взаимодействие между VEGF и VEGF-рецептором 2 (KDR, человек; Flk-1, мышь) является ключевым для патологического ангиогенеза и участвует в развитии атеросклеротических бляшек (см., например, Inoue et al., 1998). Вакцинация против KDR приводит к активации Т-клеток, подавлению неоангиогенеза и выраженному снижению атеросклероза, которое не зависело от гиперхолестеринемии как у самцов, так и у самок мышей (см., например, Petrovan et al., 2007).

Ожирение

Образование новых сосудов в жировой ткани во время индуцированного диетой ожирения происходит главным образом из-за ангиогенеза, а не васкулогенеза de novo. Антиангиогенное лечение путем блокирования VEGFR2, но не VEGFR1, может ограничить увеличение жировой ткани (см., например, Tarn et al., 2009).

Ретинопатия и макулопатия

Аномальная активация системы VEGF-VEGFR тесно вовлечена в прогрессирование возрастной макулярной дегенерации (AMD). Поэтому аптамер против VEGF-Ai65, VEGF-нейтрализующее антитело (Fab-типа) и VEGF-Трап одобрены в настоящее время для лечения AMD (см., например, Masabumi et al., 2013). Бевазумаб, антитело против VEGF, используется не по прямому назначению при таких состояниях, как AMD, диабетическая ретинопатия и диабетический макулярный отек (DME) (см., например, Rotsos et al., 2008).

Нейропатический болевой синдром

VEGF и VEGFR2 участвуют в патогенезе нейропатической боли. Лечение с антителом против rVEGF у крыс CCI может облегчать хроническую нейропатическую боль посредством снижения экспрессии рецепторов VEGFR2 и P2X2/3 на нейронах DRG для ингибирования передачи сигналов нейропатической боли (см., например, Lin et al., 2010).

Ревматоидный артрит

РТК787/ZK222584, ингибиторы рецепторной тирозинкиназы со специфической активностью против VEGFR, которые демонстрируют сильное ингибирование VEGF-R2 (KDR) и немного более слабое ингибирование VEGFR1 (Flt-1), Flk-1 (мышинный гомолог KDR) и Flt-4 (рецептор, обнаруженный в лимфатической системе), ингибировали припухлость коленного сустава на 40%, баллы тяжести (на 51%) и общие гистологические баллы у мышей с артритом, индуцированным коллагеном (см., например, Grosios et al., 2004)

TIE

Ангиопоэтин 1 (Ang1), лиганд для эндотелий-специфической рецепторной тирозинкиназы TIE-2, представляет собой ангиогенный фактор (см., например, Davis et al., 1996; Partanen et al., 1992; Davis et al., 1994; Davis et al., 1996; Alitalo et al., 1996; Godowski et al., 1997). Аббревиатура TIE представляет собой "тирозинкиназу, содержащую домены, гомологичные к Ig и EGF". TIE используется для идентификации класса рецепторных тирозинкиназ, которые экспрессируются исключительно в эндотелиальных клетках сосудов и ранних гемопоэтических клетках. Как правило, рецепторные киназы TIE характеризуются наличием EGF-подобного домена и иммуноглобулин (IG)-подобного домена, который состоит из внеклеточных сворачивающихся блоков, стабилизированных внутриклеточными дисульфидными связями (см., например, Partanen et al., 1999). В отличие от VEGF, который функционирует на ранних стадиях развития сосудов, Ang1 и его рецептор TIE-2 функционируют на более поздних стадиях развития сосудов, т.е. во время ремоделирования сосудов (ремоделирование относится к формированию просвета сосудов) и созревания (см., например, Yancopoulos et al., 1998; Peters et al., 1998; Suri et al., 1996).

Следовательно, можно ожидать, что ингибирование TIE-2 будет служить для нарушения ремоделирования и созревания новой сосудистой сети, инициированной ангиогенезом, тем самым нарушая ангиогенный процесс.

p38

p38 является членом семейства MAPK размером 38 кДа, которая активируется в ответ на стресс и играет важную роль в иммунном ответе, выживании и дифференцировке клеток. Были описаны четыре MAPK-киназы p38; эти белки имеют высокую степень гомологии (p38 α , β , γ и 5). MAPK p38 могут активироваться различными стимулами, такими как факторы роста, воспалительные цитокины или различный стресс окружающей среды. MAPK p38 могут, в свою очередь, активировать ряд нижележащих мишеней, в том числе протеинкиназы, цитозольные субстраты, транскрипционные факторы и факторы ремоделирования хроматина. Сильная активация MAPK p38 цитокинами и клеточным стрессом в целом способствует ингибированию роста клеток и индуцирует апоптоз (см., например, обзор в Cuadrado et al.,

2010). В последнее время было обнаружено, что p38 α играет важную роль в поддержании гомеостаза и связанных с ним патологий. Наиболее известная и наиболее широко освещаемая роль p38 α при болезни связана с ее функцией при передаче сигналов цитокинов и стимулировании патологического воспаления. Некоторые исследования показали, как p38 α может опосредовать ряд моделей заболеваний, в том числе ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, онкогенез, сердечно-сосудистые заболевания и инсульт. Кроме того, есть свидетельства о роли MAPK p38 в развитии и поддержании ряда заболеваний легких, таких как астма, муковисцидоз, идиопатический фиброз легких и хроническая обструктивная болезнь легких. Таким образом, p38 α представляет собой интересную фармацевтическую мишень, особенно из-за ее важной роли в воспалительных заболеваниях (см., например, обзор в Oeztuerk-Winder et al., 2012). Пиридинил-имидазольные лекарственные средства, такие как SB203580, были первыми идентифицированными ингибиторами MAPK p38, которые конкурентно связываются в АТР-связывающем кармане и широко применяются для исследования функций MAPK p38 (см., например, Coulthard et al., 2009).

SRC

c-SRC принадлежит к нерецепторным киназам семейства SRC (SFK). Эти белки вовлечены во многие клеточные события, такие как пролиферация, выживание и подвижность клеток. Таким образом, гиперактивация передачи сигналов SRC способствует различным аспектам развития опухоли. Наиболее известной функцией c-SRC является ее активное взаимодействие с трансмембранными рецепторными тирозинкиназами (RTK) на клеточной мембране посредством ее доменов SH2 и SH3. c-SRC взаимодействует с многими RTK, в том числе с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), рецептором эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), рецептором фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептором инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1R) и c-Met/рецептором фактора роста гепатоцитов (HGFR). С помощью этих взаимодействий c-SRC интегрирует и регулирует передачу сигналов RTK и непосредственно преобразовывает сигналы выживания для нижерасположенных эффекторов, таких как фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), Akt и переносчик сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3) (см., например, Zhang et al., 2012). Другие мембранные рецепторы, такие как интегрины, также могут активировать c-SRC, запуская таким образом сигнальный каскад, который регулирует миграцию клеток, адгезию и инвазию. Активация c-Src через взаимодействие с катенином p120 способствует диссоциации межклеточных адгезионных контактов, повышая таким образом подвижность клеток. c-SRC непосредственно фосфорилирует киназу фокальной адгезии (FAK), стабилизирующую комплексы фокальной адгезии, которые состоят из FAK, паксиллина, RhoA и других компонентов, и повышает адгезию клеток к внеклеточному матриксу. Кроме того, c-SRC играет важную роль в регуляции микроокружения опухоли. Активация c-SRC при гипоксии способствует ангиогенезу путем стимуляции экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), матриксных металлопротеиназ (MMP) и интерлейкина-8 (IL-8) (см., например, Yeatman et al., 2004).

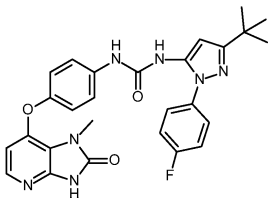
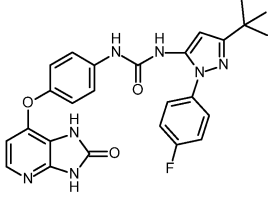
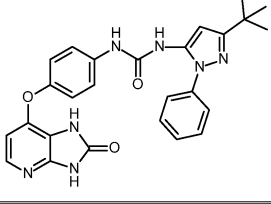
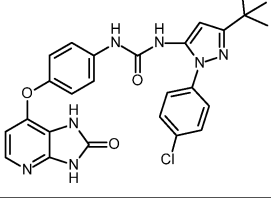
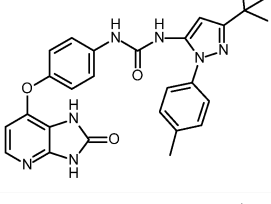
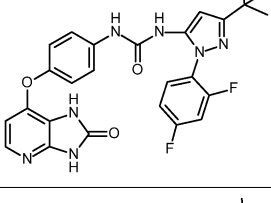
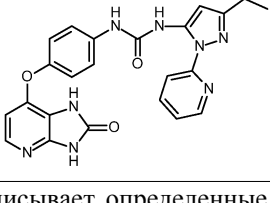
Нацеливание на SFK представляет собой хорошо отработанный терапевтический подход для многих видов рака. Дазатиниб является перорально доступным низкомолекулярным мультикиназным ингибитором, который эффективно ингибирует киназы семейства SRC (SRC, LCK, YES, FYN), а также BCR-ABL, c-KIT, PDGFR- α и β и киназу эфринового рецептора (см., например, Lindauer et al., 2010). В более поздних исследованиях сообщалось, что Src также вовлечена в связанный с воспалением сигнальный путь. Во многих исследованиях показано, что c-SRC играет критическую роль в опосредованных макрофагами воспалительных ответах. Важно отметить, что различные воспалительные заболевания тесно связаны с активацией макрофагов; поэтому ингибирование c-SRC может представлять собой полезную терапевтическую стратегию для опосредованных макрофагами заболеваний (см., например, Byeon et al., 2012).

Lck

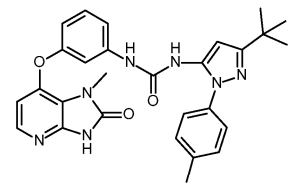
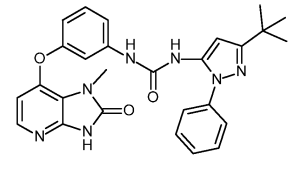
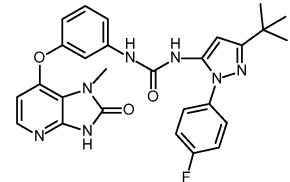
Lck (лимфоцит-специфическая киназа) представляет собой киназу SFK, которая является критической для активации Т-клеток, и ее активность индуцируется Т-клеточным рецептором (TCR). Сигналы TCR, инициированные с помощью Lck, ведут к событиям регуляции генов, приводящим к высвобождению цитокинов, пролиферации и выживанию антиген-специфических Т-клеток, тем самым усиливая специфические иммунные ответы. Ингибирование Lck, как ожидается, может предложить новый терапевтический подход для лечения опосредованных Т-клетками аутоиммунных и воспалительных заболеваний и/или отторжения трансплантата органа (см., например, Martin et al., 2010).

Известные соединения

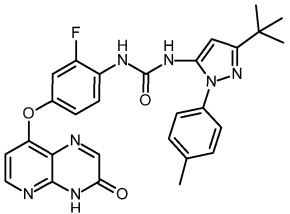
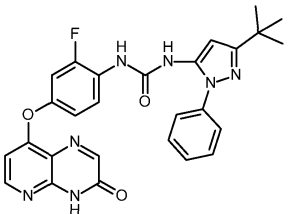
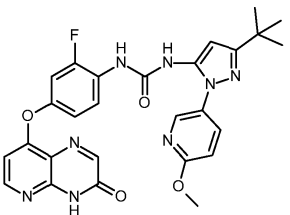
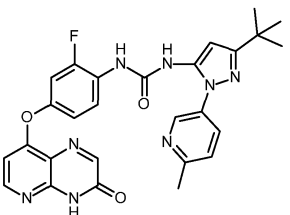
Niculescu-Duvaz et al., 2006, описывает определенные соединения имидазо[4,5-b]пиридин-2-она и оксазоло[4,5-b]пиридин-2-она, которые, *inter alia*, ингибируют активность RAF (например, BRAF) и которые пригодны при лечении пролиферативных нарушений, таких как рак. Ряд соединений, показанных в их работе, имеют 5-(трет-бутил)-2-(фенил)пиразол-3-ильную группу или 5-(трет-бутил)-2-(пиридил)пиразол-3-ильную группу. Вместе с тем, в каждом случае фенильная и пиридилная группа является незамещенной, пара-замещенной или орто,пара-дизамещенной; ни в одном из этих соединений она не является мета-замещенной. Ниже представлены следующие соединения.

Структура	Ссылка
	CJS 3247
	CJS 3600
	CJS 3608
	CJS 3609
	CJS 3614
	CJS 3615
	CJS 3617

Niculescu-Duvaz et al., 2007, описывает определенные соединения имидазо[4,5-*b*]пиридин-2-она и оксазоло[4,5-*b*]пиридин-2-она, которые, *inter alia*, ингибируют активность RAF (например, BRAF) и которые пригодны при лечении пролиферативных нарушений, таких как рак. Ряд соединений, показанных в их работе, имеют 5-(трет-бутил)-2-(фенил)пиразол-3-ильную группу. Вместе с тем, в каждом случае фенильная группа является незамещенной или пара-замещенной; ни в одном из этих соединений она не является мета-замещенной. Ниже представлены следующие соединения.

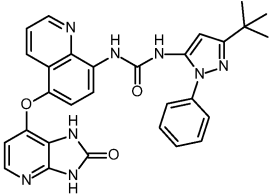
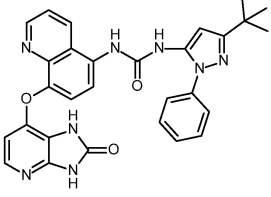
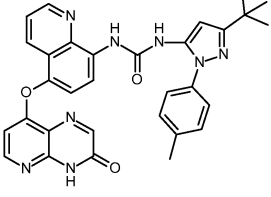
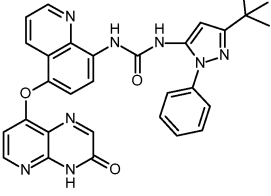
Структура	Ссылка
	CJS 3683
	CJS 3741
	CJS 3742

Springer et al., 2009, описывает определенные пиридо[2,3-*b*]пиазин-8-замещенные соединения, которые, *inter alia*, ингибируют активность RAF (например, BRAF) и которые пригодны при лечении пролиферативных нарушений, таких как рак. Ряд соединений, показанных в их работе, имеет 5-(трет-бутил)-2-(фенил)пиазол-3-ильную группу или 5-(трет-бутил)-2-(пиридил)пиазол-3-ильную группу. Вместе с тем, в каждом случае фенильная и пиридилная группа является незамещенной или пара-замещенной; ни в одном из этих соединений она не является мета-замещенной. Ниже представлены следующие соединения.

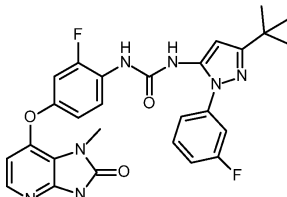
Структура	Ссылка
	Соединение AA-018
	Соединение AA-019
	Соединение AA-062
	Соединение AA-084

Niculescu-Duvaz et al., 2009, описывает определенные арил-хинолинильные соединения, которые, *inter alia*, ингибируют активность RAF (например, BRAF) и которые пригодны при лечении пролиферативных нарушений, таких как рак. Ряд соединений, показанных в их работе, имеют 5-(трет-бутил)-2-

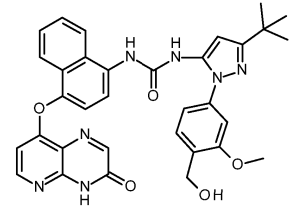
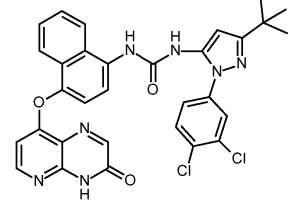
(фенил)пиразол-3-ильную группу. Вместе с тем, в каждом случае фенильная группа является незамещенной или пара-замещенной; ни в одном из этих соединений она не является мета-замещенной. Ниже представлены следующие соединения.

Структура	Ссылка
	AA-005
	AA-006
	BB-007
	BB-008

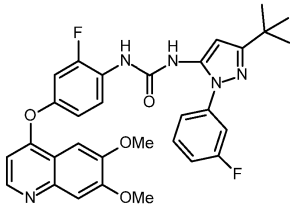
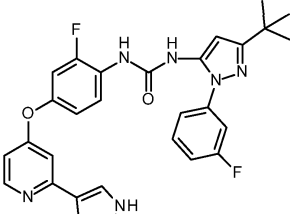
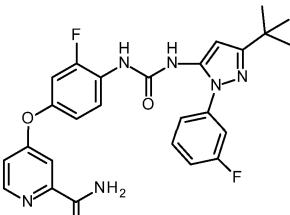
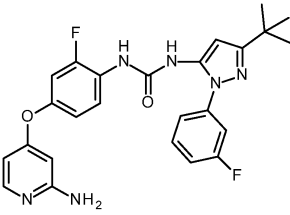
Springer et al., 2011 описывает определенные соединения 1-(5-трет-бутил-2-фенил-2H-пиразол-3-ил)-3-[2-фтор-4-(1-метил-2-оксо-2,3-дигидро-1H-имидazo[4,5-b]пиридин-7-илокси)фенил]мочевины, которые, *inter alia*, ингибируют активность RAF (например, BRAF) и которые пригодны при лечении пролиферативных нарушений, таких как рак. Ниже представлено следующее соединение.

Структура	Ссылка
	Соединение AA-04

Murray et al., 2011, описывает определенные соединения для применения при лечении воспалительного заболевания или респираторного нарушения. Некоторые из соединений, показанных в их работе, имеют 5-(трет-бутил)-2-(фенил)пиразол-3-ильную группу или 5-(трет-бутил)-2-(пиридил)пиразол-3-ильную группу. Вместе с тем, в каждом случае фенильная и пиридинильная группа является незамещенной, пара-замещенной или мета, пара-замещенной; ни в одном из этих соединений она не является мета-замещенной, пара-замещенной. Ниже представлены следующие соединения.

Структура	Ссылка
	Пример 18 (страница 58)
	Пример 32 (страница 63)

Известен ряд соединений, имеющих 5-(трет-бутил)-2-(3-фторфенил)пиразол-3-ильную группу, в том числе следующие.

Структура	Ссылка
	Furuta <i>et al.</i> , 2012
	Flynn <i>et al.</i> , 2008
	Smith <i>et al.</i> , 2007
	Cantin <i>et al.</i> , 2007

Краткое описание изобретения

Один из аспектов настоящего изобретения относится к определенным соединениям 1-(5-трет-бутил-2-арилпиразол-3-ил)-3-[2-фтор-4-[(3-оксо-4H-пиридо[2,3-b]пиразин-8-ил)окси]фенил]мочевины (называемым в данном документе "соединения ТВАР"), описываемым в данном документе.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей соединения ТВАР, описываемое в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к способу получения композиции (например, фармацевтической композиции), включающему этап смешивания соединения ТВАР, описываемого в данном документе, и фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к способу ингибирования функции (на-

пример, в клетке) RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.) *in vitro* или *in vivo*, включающему приведение клетки в контакт с эффективным количеством соединения ТВАР, описываемого в данном документе.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к соединению ТВАР, описываемому в данном документе, для применения в способе лечения организма человека или животного посредством терапии, например, для применения в способе лечения нарушения (например, заболевания), описываемого в данном документе.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к применению соединения ТВАР, описываемого в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата, например, для применения в способе лечения нарушения (например, заболевания), описываемого в данном документе.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к способу лечения, например способу лечения нарушения (например, заболевания), описываемого в данном документе, включающему введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества соединения ТВАР, описываемого в данном документе, предпочтительно в форме фармацевтической композиции.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к набору, содержащему:

(а) соединение ТВАР, описываемое в данном документе, предпочтительно обеспеченное в виде фармацевтической композиции и в подходящем контейнере и/или с подходящей упаковкой; и

(b) инструкции для применения, например, письменных инструкций о том, как вводить соединение.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к соединению ТВАР, получаемому способом синтеза, описываемым в данном документе, или способом, включающим способ синтеза, описываемый в данном документе.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к соединению ТВАР, полученному способом синтеза, описываемым в данном документе, или способом, включающим способ синтеза, описываемый в данном документе.

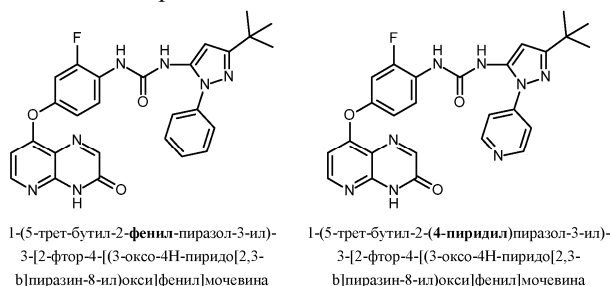
Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к новым промежуточным соединениям, описываемым в данном документе, которые пригодны для применения в способах синтеза, описываемых в данном документе.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к применению таких новых промежуточных соединений, описываемых в данном документе, в способах синтеза, описываемых в данном документе.

Как будет понятно специалисту в данной области, признаки и предпочтительные варианты осуществления одного из аспектов настоящего изобретения также относятся к другим аспектам настоящего изобретения.

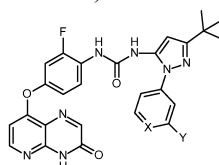
Подробное описание изобретения Соединения

Один из аспектов настоящего изобретения относится к определенным соединениям 1-(5-трет-бутил-2-арил-пиразол-3-ил)-3-[2-фтор-4-[(3-оксо-4Н-пиридо[2,3-*b*]пиразин-8-ил)окси]фенил]мочевины, которые являются структурно родственными представленным ниже соединениям.



Более конкретно, настоящее изобретение относится к некоторым родственным соединениям, которые дополнительно имеют один мета-заместитель (обозначенный в данном документе как -Y).

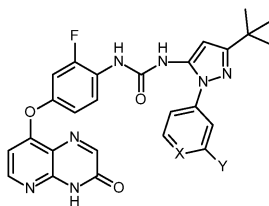
Таким образом, один из аспектов настоящего изобретения относится к соединениям, выбранным из соединений следующей формулы, и их фармацевтически приемлемым солям, N-оксидам, гидратам и сольватам, где =X- и -Y имеют значения, определяемые в данном документе (для удобства все вместе называемые в данном документе "соединения ТВАР"):



Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают в себя представленные ниже.

(1) Соединение, выбранное из соединений следующей формулы и их фармацевтически приемлемых

солей, N-оксидов, гидратов и сольватов:



где

=X- независимо представляет собой =CH- или =N-;

-Y независимо представляет собой -Y¹, -Y², -Y³, -Y⁴, -Y⁵ или -Y⁶;

-Y¹ независимо представляет собой -F, -Cl, -Br или -I;

-Y² представляет собой линейный или разветвленный насыщенный C₁₋₄алкил;

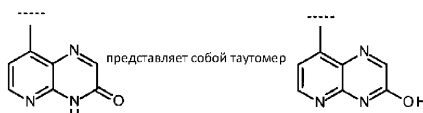
-Y³ представляет собой линейный или разветвленный насыщенный C₁₋₄галогеналкил;

-Y⁴ представляет собой -OH;

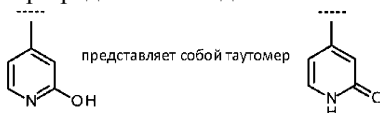
-Y⁵ представляет собой линейную или разветвленную насыщенную C₁₋₄алкокси и

-Y⁶ представляет собой линейную или разветвленную насыщенную C₁₋₄галогеналкокси.

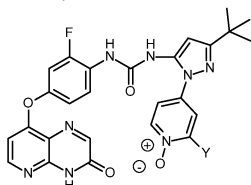
Следует отметить, что таутомеризация возможна на 3-оксо-3,4-дигидропиридо[3,2-b]пиазин-8-ильной группе, как показано ниже. Если не указано иное, то ссылка на один таутомер предназначена для ссылки на оба таутомера.



Следует отметить, что когда -X= представляет собой -N= и -Y представляет собой -Y⁴ (т.е. -OH), таутомеризация возможна на полученной 2-гидроксипирид-4-ильной группе, как показано ниже. Если не указано иное, то ссылка на один таутомер предназначена для ссылки на оба таутомера.



Следует отметить, что когда =X- представляет собой =N-, полученная группа является пиридил-4-ильной группой и может образовываться N-оксид, как показано ниже.



Во избежание недоразумений выражение "линейный или разветвленный насыщенный C₁₋₄галогеналкил" относится к линейной или разветвленной насыщенной C₁₋₄алкильной группе, которая имеет 1 или несколько (например, 1, 2, 3 и т.д.) галогеновых (например, -F, -Cl, -Br, -I) заместителей. Примером такой группы является -CF₃.

Во избежание недоразумений выражение "линейная или разветвленная насыщенная C₁₋₄алкокси" относится к группе -OR, где R представляет собой линейную или разветвленную насыщенную C₁₋₄алкильную группу. Примером такой группы является -OMe.

Аналогичным образом, выражение "линейная или разветвленная насыщенная C₁₋₄галогеналкокси" относится к группе -OR, где R представляет собой линейную или разветвленную насыщенную C₁₋₄галогеналкильную группу. Примером такой группы является -OCF₃.

Во избежание недоразумений метил сокращается как -Me; этил сокращается как -Et; n-пропил сокращается как -nPr; изопропил сокращается как -iPr; n-бутил сокращается как -nBu; изобутил сокращается как -iBu; втор-бутил сокращается как -sBu; трет-бутил сокращается как -tBu; и фенил сокращается как -Ph.

Группа =X-

(2) Соединение по (1), где =X- представляет собой =CH-.

(3) Соединение по (1), где =X- представляет собой =N-.

Группа -Y

(4) Соединение по любому из (1)-(3), где -Y представляет собой -Y¹.

(5) Соединение по любому из (1)-(3), где -Y представляет собой -Y².

(6) Соединение по любому из (1)-(3), где -Y представляет собой -Y³.

(7) Соединение по любому из (1)-(3), где -Y представляет собой -Y⁴.

(8) Соединение по любому из (1)-(3), где -Y представляет собой -Y⁵.

(9) Соединение по любому из (1)-(3), где -Y представляет собой -Y⁶.

Группа -Y¹

(10) Соединение по любому из (1)-(9), где -Y¹, если присутствует, независимо представляет собой -F, -Cl, -Br.

(11) Соединение по любому из (1)-(9), где -Y¹, если присутствует, независимо представляет собой -F или -Cl.

(12) Соединение по любому из (1)-(9), где -Y¹, если присутствует, представляет собой -F.

(13) Соединение по любому из (1)-(9), где -Y¹, если присутствует, представляет собой -Cl.

(14) Соединение по любому из (1)-(9), где -Y¹, если присутствует, представляет собой -Br.

(15) Соединение по любому из (1)-(9), где -Y¹, если присутствует, представляет собой -I.

Группа -Y²

(16) Соединение по любому из (1)-(15), где -Y², если присутствует, независимо представляет собой -Me, -Et, -nPr, -iPr, -nBu, -iBu, -sBu или -tBu.

(17) Соединение по любому из (1)-(15), где -Y², если присутствует, независимо представляет собой -Me, -Et, -nPr или -iPr.

(18) Соединение по любому из (1)-(15), где -Y², если присутствует, независимо представляет собой -Me или -Et.

(19) Соединение по любому из (1)-(15), где -Y², если присутствует, представляет собой -Me.

Группа -Y³

(20) Соединение по любому из (1)-(19), где -Y³, если присутствует, представляет собой линейный или разветвленный насыщенный C₁₋₄фторалкил.

(21) Соединение по любому из (1)-(19), где -Y³, если присутствует, независимо представляет собой -CH₂F, -CHF₂, -CF₃, -CH₂CH₂F, -CH₂CHF₂ или -CH₂CF₃.

(22) Соединение по любому из (1)-(19), где -Y³, если присутствует, независимо представляет собой -CH₂F, -CHF₂ или -CF₃.

(23) Соединение по любому из (1)-(19), где -Y³, если присутствует, представляет собой -CF₃.

Группа -Y⁵

(24) Соединение по любому из (1)-(23), где -Y⁵, если присутствует, независимо представляет собой -O-Me, -O-Et, -O-nPr, -O-iPr, -O-nBu, -O-iBu, -O-sBu или -O-tBu.

(25) Соединение по любому из (1)-(23), где -Y⁵, если присутствует, независимо представляет собой -O-Me, -O-Et, -O-nPr или -O-iPr.

(26) Соединение по любому из (1)-(23), где -Y⁵, если присутствует, независимо представляет собой -O-Me или -O-Et.

(27) Соединение по любому из (1)-(23), где -Y⁵, если присутствует, представляет собой -O-Me.

Группа -Y⁶

(28) Соединение по любому из (1)-(27), где -Y⁶, если присутствует, представляет собой линейную или разветвленную насыщенную C₁₋₄фторалкокси.

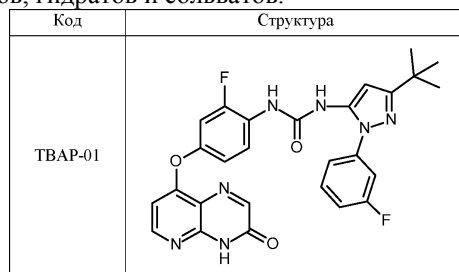
(29) Соединение по любому из (1)-(27), где -Y⁶, если присутствует, независимо представляет собой -O-CH₂F, -O-CHF₂, -O-CF₃, -O-CH₂CH₂F, -O-CH₂CHF₂ или -O-CH₂CF₃.

(30) Соединение по любому из (1)-(27), где -Y⁶, если присутствует, независимо представляет собой -O-CH₂F, -O-CHF₂ или -O-CF₃.

(31) Соединение по любому из (1)-(27), где -Y⁶, если присутствует, представляет собой -O-CF₃.

Некоторые предпочтительные соединения

(32) Соединение по (1), выбранное из соединений представленных ниже формул и их фармацевтически приемлемых солей, N-оксидов, гидратов и сольватов.



ТВАР-02	
ТВАР-03	
ТВАР-04	
ТВАР-05	

Комбинации

Следует понимать, что определенные признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. Наоборот, различные признаки настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей субкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к химическим группам, представленным переменными (например, =X-, -Y, -Y¹, -Y², -Y³, -Y⁴, -Y⁵, -Y⁶ и т.д.), конкретно охвачены настоящим изобретением и раскрыты в данном документе так же, как если бы каждая комбинация была по отдельности и в явном виде раскрыта в той степени, что такие комбинации охватывают соединения, которые являются стабильными соединениями (т.е. соединения, которые могут быть выделены, охарактеризованы и испытаны на биологическую активность). Кроме того, все субкомбинации химических групп, перечисленных в вариантах осуществления, описывающих такие переменные, также конкретно охвачены настоящим изобретением и раскрыты в данном документе так, как если бы каждая такая субкомбинация химических групп была по отдельности и в явном виде раскрыта в данном документе.

По существу, очищенные формы

Один из аспектов настоящего изобретения относится к соединениям ТВАР, описываемым в данном документе, в по существу очищенной форме и/или в форме, по существу, не содержащей загрязняющих примесей.

В одном из вариантов осуществления соединение находится в по существу очищенной форме и/или в форме, по существу, не содержащей загрязняющих примесей.

В одном из вариантов осуществления соединение находится в по существу очищенной форме с чистотой по меньшей мере 50 вес.%, например, по меньшей мере 60 вес.%, например, по меньшей мере 70 вес.%, например, по меньшей мере 80 вес.%, например, по меньшей мере 90 вес.%, например, по меньшей мере 95 вес.%, например, по меньшей мере 97 вес.%, например, по меньшей мере 98 вес.%, например, по меньшей мере 99 вес.%.

В одном из вариантов осуществления соединение находится в форме, по существу не содержащей загрязняющих примесей, где загрязняющие примеси составляют не более чем 50 вес.%, например не более чем 40 вес.%, например не более чем 30 вес.%, например не более чем 20 вес.%, например не более чем 10 вес.%, например не более чем 5 вес.%, например не более чем 3 вес.%, например не более чем 2

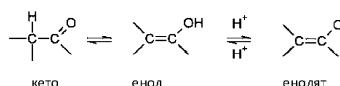
вес.%, например не более чем 1 вес.%. Если не указано иное, загрязняющие примеси относятся к другим соединениям.

Изомеры

Определенные соединения могут существовать в одной или нескольких конкретных геометрических, оптических, энантиомерных, диастереомерных, эпимерных, атропоизомерных, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, в том числе без ограничения в цис- и транс-формах; E- и Z-формах; c-, t- и g- формах; эндо- и экзоформах; R-, S- и мезоформах; D- и L-формах; d- и l-формах; формах (+) и (-); кето-, енол-и енолят-формах; син- и анти-формах; синклиальной и антиклиальной формах; α - и β -формах; аксиальной и экваториальной формах; в формах лодки, кресла, "твист", конверта и полукресла и их комбинаций, в дальнейшем совместно именуемых "изомерами" (или "изомерными формами").

Следует отметить, что за исключением описанного ниже для таутомерных форм, специально исключенными из термина "изомеры", используемого в данном документе, являются структурные (или конституциональные) изомеры (т.е. изомеры, которые отличаются связями между атомами, а не только положением атомов в пространстве). Например, ссылка на метоксигруппу $-OCH_3$ не должна истолковываться как ссылка на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу $-CH_2OH$. Аналогичным образом, ссылка на ортохлорфенил не должна истолковываться как ссылка на его структурный изомер, метаклорфенил. Вместе с тем ссылка на класс структур вполне может включать в себя структурно изомерные формы, попадающие в пределы этого класса (например, C_{1-7} алкил включает n-пропил и изопропил; бутил включает n-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

Вышеприведенное исключение не относится к таутомерным формам, например, кето-, енол- и енолят-формам, как например, в следующих таутомерных парах: кето/енол (показываемая ниже), имин/енамин, амид/иминоспирт, амидин/амидин, нитрозо/оксим, тиокетон/энетiol, N-нитрозо/гидроксиазо и нитро/ацинитро.



Следует отметить, что специально включенными в термин "изомер" являются соединения с одним или несколькими изотопными замещениями. Например, H может находиться в любой изотопной форме, в том числе 1H , 2H (D) и 3H (T); C может находиться в любой изотопной форме, в том числе ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C ; O может находиться в любой изотопной форме, в том числе ^{16}O и ^{18}O ; и тому подобное.

Если не указано иное, ссылка на конкретное соединение включает все такие изомерные формы, в том числе их смеси. Способы получения и выделения таких изомерных форм либо известны в данной области, либо могут быть легко получены путем адаптации способов, изложенных в данном документе, или известными способами, известным образом.

Соли

Может быть удобно или желательно получить, очистить и/или обработать соответствующую соль соединения, например, фармацевтически приемлемую соль. Примеры фармацевтически приемлемых солей обсуждаются в Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., vol. 66, pp. 1-19.

Например, если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, $-COOH$ может представлять собой $-COO^-$), тогда соль может быть образована с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают без ограничения ионы щелочных металлов, такие как Na^+ и K^+ , щелочно-земельные катионы, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} . Примеры подходящих органических катионов включают без ограничения ион аммония (т.е. NH_4^+) и замещенные ионы аммония (например, NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3 , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются полученные из: этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглюмина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером распространенного иона четвертичного аммония является $N(CH_3)_4^+$.

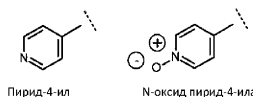
Если соединение является катионным или имеет функциональную группу, которая может быть катионной (например, $-NH_2$ может быть $-NH_3^+$), тогда соль может быть образована с помощью подходящего аниона. Примеры подходящих неорганических анионов включают без ограничения полученные из следующих неорганических кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой.

Примеры подходящих органических анионов включают без ограничения полученные из следующих органических кислот: 2-ацетоксибензойная, уксусная, аскорбиновая, аспарагиновая, бензойная, камфорсульфоновая, коричневая, лимонная, эдетовая, этандисульфоновая, этансульфоновая, муравьиная, fumarо-вая, глюкогептоновая, глюконовая, глутаминовая, гликолевая, гидроксималеиновая, гидроксинафталин-карбоновая, изэтионовая, молочная, лактобионовая, лауриновая, малеиновая, яблочная, метансульфоно-вая, муциновая, олеиновая, щавелевая, пальмитиновая, памовая, пантотеновая, фенилуксусная, фенил-сульфоновая, пропионовая, пировиноградная, салициловая, стеариновая, янтарная, сульфаниловая, вин-

ная, толуолсульфоновая и валериановая. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают без ограничения полученные из следующих полимерных кислот: дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза.

Если не указано иное, ссылка на конкретное соединение также включает его солевые формы. N-оксиды

Может быть удобно или желательно получить, очистить и/или обработать соответствующий N-оксид соединения. Например, соединение, имеющее пиридинильную группу, может быть получено, очищено и/или обработано в виде соответствующего N-оксида.



Если не указано иное, ссылка на конкретное соединение также включает его N-оксидные формы.

Гидраты и сольваты

Может быть удобно или желательно получить, очистить и/или обработать соответствующий сольват соединения. Термин "сольват" используется в данном документе в обычном смысле по отношению к комплексу растворенного вещества (например, соединения, соли соединения) и растворителя. Если растворителем является вода, сольват может обычно называться гидратом, например, моногидратом, дигидратом, тригидратом и т.д.

Если не указано иное, ссылка на конкретное соединение также включает его сольватные и гидратные формы.

Химически защищенные формы

Может быть удобно или желательно получить, очистить и/или обработать соединение в химически защищенной форме. Выражение "химически защищенная форма" используется в данном документе в обычном химическом смысле и относится к соединению, в котором одна

или несколько реакционноспособных функциональных групп защищены от нежелательных химических реакций при определенных условиях (например, pH, температура, излучение, растворитель и тому подобное). На практике хорошо известные химические способы используются для того, чтобы обратимо сделать неактивной функциональную группу, которая иначе была бы реакционноспособной при определенных условиях. В химически защищенной форме одна или несколько реакционноспособных функциональных групп находятся в форме защищенной или защитной группы (также известной как замаскированная или маскирующая группа или заблокированная или блокирующая группа). При защите реакционноспособной функциональной группы можно проводить реакции, использующие другие незащищенные реакционноспособные группы, не оказывая влияния на защищенную группу; защитную группу можно удалить, обычно на следующем этапе, без существенного воздействия на остальную часть молекулы. См., например, *Protective Groups in Organic Synthesis* (T. Greene and P. Wuts; 4th Edition; John Wiley and Sons, 2006).

Большое разнообразие таких "защитных", "блокирующих" или "маскирующих" способов широко используются и хорошо известны в органическом синтезе. Например, из соединения, которое имеет две неэквивалентные реакционноспособные функциональные группы, обе из которых были бы реакционноспособными при определенных условиях, можно получить производное с превращением одной из функциональных групп в "защищенную" и, следовательно, неактивную при определенных условиях; защищенное таким образом соединение может использоваться в качестве реагента, который фактически имеет только одну реакционноспособную функциональную группу. После того, как необходимая реакция (с участием другой функциональной группы) завершена, защищенную группу можно сделать "незащищенной" с возвращением ей исходной функциональности.

Например, гидроксильная группа может быть защищена в виде эфира (-OR) или сложного эфира (-OC(=O)R), как, например, трет-бутиловый эфир; бензильный, бензгидриловый (дифенилметильный) или тритильный (трифенилметильный) эфир; триметилсилиловый или трет-бутилдиметилсилиловый эфир или ацетильный сложный эфир (-OC(=O)CH₃, -OAc).

Например, альдегидная или кетонная группа может быть защищена в виде ацеталя (R-CH(OR)₂) или кеталя (R₂C(OR)₂), соответственно, в которых карбонильная группа (>C=O) превращается в диэфирную (>C(OR)₂) в результате реакции, например, с первичным спиртом. Альдегидную или кетонную группу легко регенерировать путем гидролиза с использованием большого избытка воды в присутствии кислоты.

Пролекарства

Может быть удобно или желательно получить, очистить и/или обработать соединение в форме пролекарства. Выражение "пролекарство", используемое в данном документе, относится к соединению, которое при метаболизировании (например, *in vivo*) дает желаемое активное соединение. Как правило, пролекарство является неактивным или менее активным, чем желаемое активное соединение, но может обеспечить выгодную обработку, введение или метаболические свойства.

Например, некоторые пролекарства представляют собой сложные эфиры активного соединения

(например, физиологически приемлемый метаболически неустойчивый сложный эфир). В ходе метаболизма эфирная группа (-C(=O)OR) расщепляется с образованием активного лекарственного средства. Такие сложные эфиры могут быть образованы путем эстерификации, например, любой из групп карбоновой кислоты (-C(=O)OH) в исходном соединении и, в случае необходимости, с предшествующей защитой любых других реакционноспособных групп, присутствующих в исходном соединении, с последующим снятием защиты в случае необходимости.

Кроме того, некоторые пролекарства активируются ферментативно с образованием активного соединения или соединения, которое при дальнейшей химической реакции дает активное соединение (например, как в ADEPT, GDEPT, LIDEPT и т.д.). Например, пролекарство может представлять собой производное сахара или другой гликозидный конъюгат или может представлять собой производное сложного эфира аминокислоты.

Химический синтез

Способы химического синтеза соединений по настоящему изобретению описаны в данном документе. Эти и/или другие хорошо известные способы могут быть модифицированы и/или адаптированы известным образом для того, чтобы облегчить синтез дополнительных соединений в пределах объема настоящего изобретения.

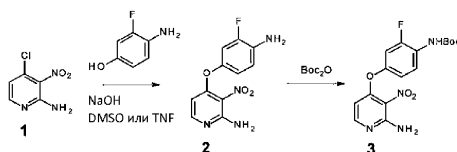
Описания общих лабораторных методов и процедур, пригодных для получения соединений, описанных в данном документе, приводятся в *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5th Edition. 1989, (Editors: Furniss, Hannaford, Smith, and Tatchell) (опубликовано Longmann, UK).

Способы синтеза пиридиновых соединений, в частности, описаны в *Heterocyclic Chemistry*. 3rd Edition. 1998, (Editors: Joule, Mills, and Smith) (опубликовано Chapman & Hall, UK).

Соединения ТВАР, описанные в данном документе, могут быть получены с помощью ключевого промежуточного соединения (2). Это промежуточное соединение может быть получено из доступных для приобретения исходных материалов, 2-амино-3-нитро-4-хлорпиридина (1) и 3-фтор-4-аминофенола. Промежуточное соединение (2) может быть селективно защищено по аминогруппе, например, как карбамат ВОС, с получением промежуточного соединения (3).

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

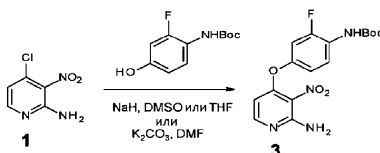
Схема 1



Промежуточное соединение (3) также может быть получено непосредственно из 2-амино-3-нитро-4-хлорпиридина (1) и N-BOC-защищенного 3-фтор-4-аминофенола.

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

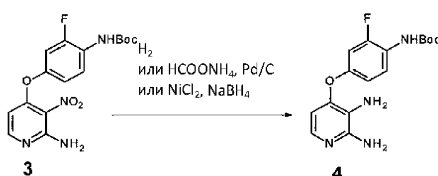
Схема 2



Нитрогруппа защищенного промежуточного соединения (3) может быть восстановлена с получением аминогруппы, например, с помощью Pd/C и формиата аммония, или водорода, или с помощью NiCl₂ и NaBH₄ с получением диамино-промежуточного соединения (4).

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

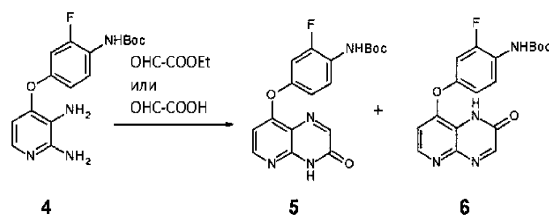
Схема 3



Пиридопирозины могут быть получены из промежуточного соединения (4) в реакции с этилгликоксилатом или глиоксиловой кислотой. Оба изомера, (5) и (6), могут быть получены из реакции (4) с этилгликоксилатом или глиоксиловой кислотой. Соотношение этих двух изомеров может зависеть от выбора реагентов и растворителей, так что предпочтительно получают один. Требуемый изомер (5) может быть выделен из смеси с помощью колоночной хроматографии или селективной кристаллизации из смеси.

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

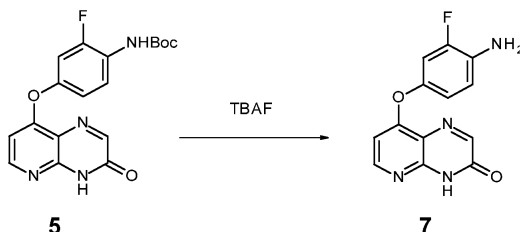
Схема 4



При снятии защиты с защитной группы (PG), например, с использованием тетрабутиламмония фторида (TBAF) для защитной группы Boc, производится общее промежуточное соединение (7).

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

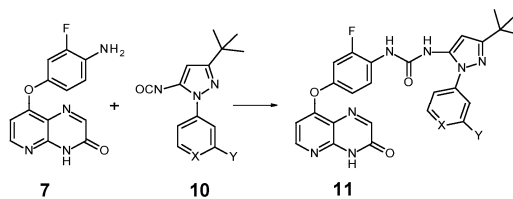
Схема 5



Ключевое промежуточное соединение (7) вступает в реакцию с 3-трет-бутил-5-изоцианато-1-арил-1Н-пиразолами (10) с получением соответствующих мочевинов (11).

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

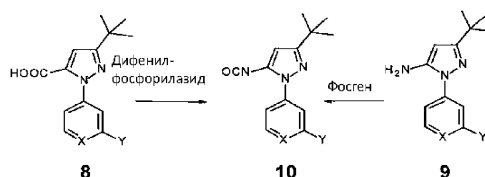
Схема 6



Соответствующие изоцианаты (10) могут быть получены, например, с помощью реакции аминов (9) с фосгеном, трифосгеном или их производными или путем превращения соответствующих карбоновых кислот (8) в ацилазиды, например, с дифенилфосфорилазидом, с последующей перегруппировкой Курциуса. Эти реагенты идентифицированы только для иллюстрации, и следует отметить, что в данной области известны другие подходящие реагенты, которые также могут быть использованы для превращения аминов или карбоновых кислот в изоцианаты.

Примеры таких способов иллюстрируются на представленной ниже схеме.

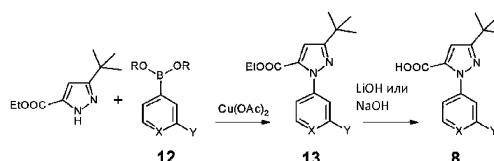
Схема 7



Необходимые карбоновые кислоты (8) могут быть получены, например, с помощью реакции соответствующих фенол- или пиридил- мета-замещенных бороновых кислот (R представляет собой H) или сложных эфиров бороновой кислоты (R представляет собой алкил) (12) с 3-трет-бутил-1Н-пиразол-5-карбоксилатным сложным эфиром с последующим гидролизом сложного эфира до карбоновой кислоты. Сложные эфиры бороновой кислоты $B(OR)_2$ включают циклические сложные эфиры, такие как 4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил.

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

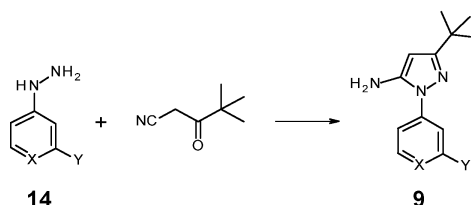
Схема 8



Желаемые амины (9) могут быть получены, например, с помощью реакции соответствующих фенол- или пиридил- мета-замещенных гидразинов (14) с 4,4-диметил-3-оксопентаннитрилом.

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

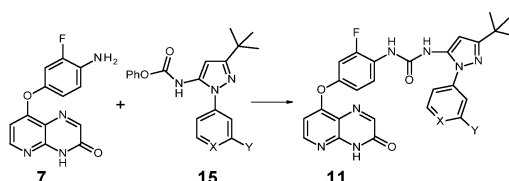
Схема 9



В альтернативном подходе промежуточное соединение (7) вступает в реакцию с активированными карбаматами 3-трет-бутил-5-амино-1-арил-1Н-пиразолов с получением соответствующих мочевин.

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

Схема 10

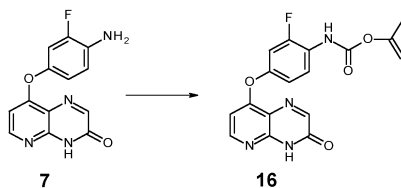


Соответствующие активированные карбаматы могут быть получены, например, в реакции аминов (9) с хлорформатами, например, с фенилхлорформиаом с образованием фенил (3-(трет-бутил)-1-арил-1Н-пиразол-5-ил)карбамата (15) или с 1-метилвинилхлорформиаом с образованием 1-метилвинил (3-(трет-бутил)-1-арил-1Н-пиразол-5-ил)карбамата.

В качестве альтернативы, аминоположение в общем промежуточном соединении (7) может быть активировано посредством реакции, например, с фенилхлорформиаом или 1-метилвинилхлорформиаом.

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

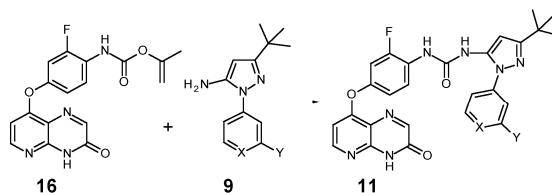
Схема 11



Активированный карбамат, образованный таким образом, может затем вступать в реакцию с ароматическим амином с получением соответствующей мочевины.

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

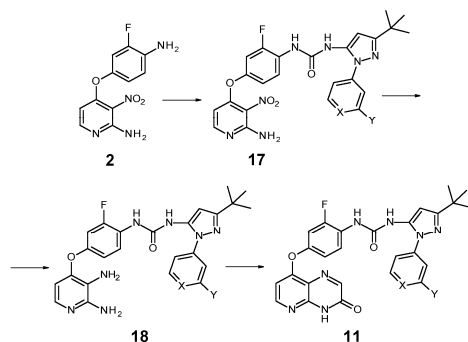
Схема 12



Активированные карбаматы, показанные на схемах 10-12 выше, представляют собой исключительно примеры. Также могут использоваться другие активированные карбаматы, известные в данной области, в том числе, например, 4-нитрофенилкарбаматы и N-гидроксисукцинимид карбаматы.

В альтернативном подходе мочевины образуются первой, до циклизации. Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

Схема 13

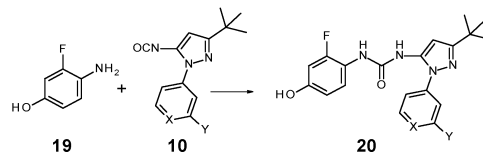


В альтернативном подходе аминофенолы могут быть превращены в мочевины с образованием про-

межточных соединений (20).

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

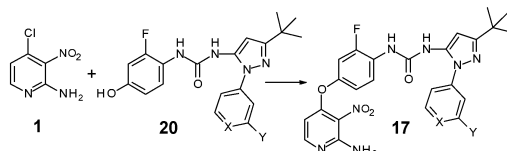
Схема 14



Промежуточные соединения (20) затем можно соединить с (1) с получением (17). Дополнительное превращение, например, описываемое выше на схеме 13, приводит к продукту (11)

Пример такого способа иллюстрируется на представленной ниже схеме.

Схема 15



Композиции

Один из аспектов настоящего изобретения относится к композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей соединение ТВАР, описываемое в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к способу получения композиции (например, фармацевтической композиции), включающему смешивание соединения ТВАР, описываемого в данном документе, и фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или вспомогательного вещества.

Применения

Соединения ТВАР, описываемые в данном документе, пригодны при лечении, например, пролиферативных нарушений (как "противоопухолевые средства"), рака (как "противораковые средства"), воспалительных заболеваний (как "противовоспалительные средства"), вирусных инфекций (как "противовирусные средства"), нейродегенеративных заболеваний (как "противонейродегенеративные средства"), фиброзных заболеваний (как "противофиброзные средства") и т.д.

Применение в способах ингибирования RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.)

Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу ингибирования работы (например, в клетке) RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.) *in vitro* или *in vivo*, включающему приведение клетки в контакт с эффективным количеством соединения ТВАР, описываемого в данном документе.

Специалист в данной области может легко определить, будет ли соединение-кандидат ингибировать RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.). Например, подходящие анализы описываются в данном документе или известны из уровня техники.

В одном из вариантов осуществления способ выполняется *in vitro*. В одном из вариантов осуществления способ выполняется *in vivo*.

В одном из вариантов осуществления соединение ТВАР обеспечивается в форме фармацевтически приемлемой композиции.

Клетки любого типа можно обрабатывать, в том числе жировой ткани, легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, кишечник, ободочную (толстую) кишку), молочной железы, яичников, предстательной железы, печени (печеночные), почки (почечные), мочевого пузыря, поджелудочной железы, головного мозга и кожи.

Например, можно вырастить образец клеток *in vitro*, привести соединение в контакт с указанными клетками и наблюдать эффект указанного соединения на эти клетки. В качестве примера «эффекта» можно определить морфологический статус клеток (например, живы или погибли и т.д.). Если обнаружено, что соединение оказывает влияние на клетки, это можно использовать в качестве прогностического или диагностического маркера эффективности соединения в способах лечения пациента, несущего клетки того же клеточного типа.

Применение в способах ингибирования пролиферации клеток и т.д.

Соединения ТВАР, описанные в данном документе, например, (a) регулируют (например, ингибируют) пролиферацию клеток; (b) ингибируют продвижение клеточного цикла; (c) стимулируют апоптоз или (d) выполняют комбинацию одного или нескольких из данного.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу регуляции (например, ингибирования) пролиферации клеток (например, пролиферации клетки), ингибирования продвижения клеточного цикла, стимуляции апоптоза или комбинации одного или нескольких из данного *in vitro* или *in vivo*, включающему приведение клетки в контакт с эффективным количеством соединения ТВАР, описываемого в данном документе.

В одном из вариантов осуществления способ представляет собой способ регуляции (например, ингибирования) пролиферации клеток (например, пролиферации клетки) *in vitro* или *in vivo*, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством соединения ТВАР, описываемого в данном документе.

В одном из вариантов осуществления способ выполняется *in vitro*. В одном из вариантов осуществления способ выполняется *in vivo*.

В одном из вариантов осуществления соединение ТВАР обеспечивается в форме фармацевтически приемлемой композиции.

Клетки любого типа можно обрабатывать, в том числе легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, кишечник, ободочную (толстую) кишку), молочной железы, яичников, предстательной железы, печени (печеночные), почки (почечные), мочевого пузыря, поджелудочной железы, головного мозга и кожи.

Специалист в данной области может легко определить, будет ли соединение-кандидат регулировать (например, ингибировать) пролиферацию клеток и т.д. Например, анализы, которые удобно использовать для оценки активности, проявляемой конкретным соединением, описываются в данном документе.

Например, можно вырастить образец клеток (например, из опухоли) *in vitro*, привести соединение в контакт с указанными клетками и наблюдать эффект указанного соединения на эти клетки. В качестве примера "эффекта" можно определить морфологический статус клеток (например, живы или погибли и т.д.). Если обнаружено, что соединение оказывает влияние на клетки, это можно использовать в качестве прогностического или диагностического маркера эффективности соединения в способах лечения пациента, несущего клетки того же клеточного типа.

Применение в способах терапии

Еще один аспект настоящего изобретения относится к соединению ТВАР, описываемому в данном документе, для применения в способе лечения организма человека или животного с помощью терапии, например, для применения способа лечения нарушения (например, заболевания), описываемого в данном документе.

Применение в изготовлении лекарственных препаратов

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к применению соединения ТВАР, описываемого в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата, например, для применения в способе лечения нарушения (например, заболевания), описываемого в данном документе.

В одном из вариантов осуществления лекарственный препарат содержит соединение ТВАР. Способы лечения

Еще один из аспектов настоящего изобретения относится к способу лечения, например, способу лечения нарушения (например, заболевания), описываемого в данном документе, включающему введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества соединения ТВАР, описываемого в данном документе, предпочтительно в форме фармацевтической композиции.

Нарушения, подлежащие лечению - пролиферативные нарушения

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение пролиферативного нарушения.

Выражение "пролиферативное нарушение", используемое в данном документе, относится к ненужной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая является нежелательной, такой как неопластический или гиперпластический рост.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение пролиферативного нарушения, характеризующегося доброкачественной, предраковой или злокачественной клеточной пролиферацией.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение гиперплазии; новообразования; опухоли (например, гистиоцитомы, глиомы, астроцитомы, остеомы); рака; псориаза; заболевания костей; фибропролиферативного нарушения (например, соединительных тканей); фиброза легких; атеросклероза или пролиферации гладко-мышечных клеток в кровеносных сосудах (например, стеноза или рестеноза после пластической операции на сосудах).

Нарушения, подлежащие лечению - рак

В одном из вариантов осуществления (например, применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение рака.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение метастазирования рака.

К числу форм рака относятся следующие.

(1) Карциномы, в том числе опухоли, происходящие из многослойного плоского эпителия (формы плоскоклеточного рака) и опухоли, возникающие в органах или железах (аденокарциномы). Примеры включают молочную железу, прямую и ободочную кишки, легкое, поджелудочную железу, предстательную железу, яичник.

(2) Саркомы, в том числе остеосаркома и остеогенная саркома (кость); хондросаркома (хрящ); лейомиосаркома (гладкая мышца); рабдомиосаркома (скелетная мышца); мезотелиальная саркома и мезоте-

лиома (мембранная выстилка полостей тела); фибросаркома (фиброзная ткань); ангиосаркома и гемангиоэндотелиома (кровеносные сосуды); липосаркома (жировая ткань); глиома и астроцитома (нейрогенная соединительная ткань, находящаяся в головном мозге); миксосаркома (примитивная эмбриональная соединительная ткань); мезенхимальная и смешанная мезодермальная опухоль (смешанные типы соединительной ткани).

(3) Миелома.

(4) Меланомы, в том числе, например, поверхностно распространяющаяся меланома, узловатая меланома, ограниченный предраковый меланоз, акральная меланома и увеальная меланома.

(5) Гемопозитические опухоли, в том числе миелогенный и гранулоцитарный лейкоз (злокачественная опухоль миелоидного и гранулоцитарного ряда лейкоцитов); лимфатический, лимфоцитарный и лимфобластный лейкоз (злокачественная опухоль лимфоидного и лимфоцитарного ряда клеток крови); истинная полицитемия (также известная как эритремия) (злокачественная опухоль различных производных клеток крови, но с преобладанием эритроцитов).

(6) Лимфомы, в том числе лимфомы Ходжкина и неходжкинские лимфомы.

(7) Смешанные типы, в том числе, например, железисто-плоскоклеточная карцинома; смешанная мезодермальная опухоль; карциносаркома; тератокарцинома.

В одном из вариантов осуществления рак характеризуется или дополнительно характеризуется раковыми стволовыми клетками.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение рака, который является устойчивым к лечению с антителом, например, известным антителом, например, законодательно утвержденным антителом. В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение меланомы, которая является устойчивой к лечению с антителом, например известным антителом, например, законодательно утвержденным антителом. Примеры таких антител, которые известны для лечения меланомы, включают: антитела, которые связываются с CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4), такие как ипилимумаб (утверждено); антитела, которые связываются с PD-1 (рецептор программируемой гибели клеток 1), такие как пембролизумаб (утверждено) и ниволумаб (утверждено); антитела, которые связываются с PD-L1 (лиганд программируемой смерти 1), такие как MEDI4736 (в клинических испытаниях) и MPDL3280A (в клинических испытаниях); антитела и антитела-конъюгаты, которые связываются с антигенным гликопротеином меланомы NMB, такие как глембатумумаб ведотин (в клинических испытаниях); антитела, которые связывают противопухольный эндотелиальный маркер 1, такие как онтузиумаб (в клинических испытаниях); антитела, которые связываются с VEGF, такие как бевацизумаб, отдельно или в комбинации со стандартной химиотерапией или низкими дозами IFN- α 2b (в клинических испытаниях); антитела, которые связываются с ганглиозидом GD3, такие как KW-2871 (в клинических испытаниях); антитела, которые связывают изоформы интегрина, такие как $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_v\beta_6$, такие как интетумумаб (в клинических испытаниях).

Противораковый эффект может возникать благодаря одному или нескольким механизмам, включая без ограничения регуляцию пролиферации клеток, ингибирование продвижения клеточного цикла, ингибирование ангиогенеза (образования новых кровеносных сосудов), ингибирование метастазирования (распространение опухоли от места ее происхождения), ингибирование миграции клеток (распространение раковых клеток в другие части тела), ингибирование инвазии (распространение опухолевых клеток в соседние нормальные структуры), стимулирование апоптоза (запрограммированная гибель клеток), гибель от некроза или индукцию гибели посредством аутофагии. Соединения, описанные в данном документе, могут быть использованы при лечении форм рака, описанных в данном документе, независимо от механизмов, обсуждаемых в данном документе.

Нарушения, подлежащие лечению - воспаление

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение воспаления (например, воспалительного нарушения или реакции).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение острого воспаления (например, опосредованного острой инфекцией).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение хронического воспаления (например, опосредованного хронической инфекцией).

В одном из вариантов осуществления воспалительное заболевание выбрано из воспалительных заболеваний легких (например, астма; хроническая обструктивная болезнь легких (COPD)); глаза (например, увеит) и желудочно-кишечного тракта (например, болезнь Крона, язвенный колит).

В одном из вариантов осуществления воспалительное заболевание выбрано из:

(i) легочных заболеваний или нарушений, имеющих воспалительный компонент, таких как муковисцидоз, легочная гипертензия, саркоидоз легких, идиопатический фиброз легких, и, в частности, COPD (включая хронический бронхит и эмфизему), астма и астма у детей;

(ii) кожных заболеваний или нарушений, имеющих воспалительный компонент, таких как атопический дерматит, аллергический дерматит, контактный дерматит и псориаз;

(iii) назальных заболеваний или нарушений, имеющих воспалительный компонент, таких как аллергический ринит, ринит и синусит;

(iv) глазных заболеваний или нарушений, имеющих воспалительный компонент, таких как конъюнктивит, аллергический конъюнктивит, сухой кератоконъюнктивит (сухой глаз), глаукома, диабетическая ретинопатия, макулярный отек (включая диабетический макулярный отек), окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO), сухая и/или влажная возрастная макулярная дегенерация (AMD), воспаление после операции катаракты, и, в частности, увеит (в том числе задней, передней и панувеит), отторжение трансплантата роговицы и трансплантата лимбальных клеток; а также

(v) желудочно-кишечных заболеваний или нарушений, имеющих воспалительный компонент, таких как глютензависимая энтеропатия (целиакия), эозинофильный эзофагит, кишечная реакция "трансплантат против хозяина" и, в частности, болезнь Крона и неспецифический язвенный колит.

В одном из вариантов осуществления воспалительное заболевание выбрано из следующего: муковисцидоз; легочная гипертензия; саркоидоз легких; идиопатический фиброз легких; хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) (включая хронический бронхит и эмфизему); астма; астма у детей; атопический дерматит; аллергический дерматит; контактный дерматит; псориаз; аллергический ринит; ринит; синусит; конъюнктивит; аллергический конъюнктивит; сухой кератоконъюнктивит (сухой глаз); глаукома; диабетическая ретинопатия; макулярный отек (включая диабетический макулярный отек); окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO); сухая и/или влажная возрастная макулярная дегенерация (AMD); воспаление после операции катаракты; увеит (в том числе задний, передний и панувеит); отторжение трансплантата роговицы и трансплантата лимбальных клеток; глютензависимая энтеропатия (целиакия); эозинофильный эзофагит; кишечная реакция "трансплантат против хозяина"; болезнь Крона и неспецифический язвенный колит.

В одном из вариантов осуществления воспалительное заболевание представляет собой астму или COPD.

В одном из вариантов осуществления воспалительное заболевание представляет собой увеит, болезнь Крона или неспецифический язвенный колит.

Нарушения, подлежащие лечению - иммунологические нарушения

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение иммунологического нарушения.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение аллергии.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение воспалительного заболевания дыхательных путей, такого как астма.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение аллергического контактного дерматита.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение заболевания иммунной системы.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение аутоиммунного заболевания, например ревматоидного артрита; системной красной волчанки (волчанки); воспалительного заболевания кишечника (IBD); рассеянного склероза (MS); сахарного диабета 1 типа; синдрома Гийена-Барре; псориаза; болезни Грейвса; тиреоидита Хашимото; миастении гравис; васкулита; иммунодефицитного заболевания; тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID); общего переменного иммунодефицита (CVID); вируса иммунодефицита человека (HIV); синдрома приобретенного иммунодефицита (AIDS); обусловленного действием лекарственного средства иммунодефицита или синдрома "трансплантат против хозяина".

Нарушения, подлежащие лечению - вирусная инфекция

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение инфекции.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение вирусной инфекции:

(группа I:) dsDNA-вирус, например аденовирус, вирус герпеса, поксвирус;

(группа II:) ssDNA-вирус, например парвовирус;

(группа III:) dsRNA-вирус, например реовирус;

(группа IV:) (+)ssRNA-вирус, например пикорнавирус, тогавирус;

(группа V:) (-)ssRNA-вирус, например ортомиксовирус, рабдовирус;

(группа VI:) ssRNA-RT-вирус, например ретровирус; или

(группа VII:) dsDNA-RT-вирус, например, гепаднавирус.

Как используется выше: ds: двухцепочечная; ss: +цепь; (+)ssRNA: +цепь РНК; (-)ssRNA: -цепь РНК; ssRNA-RT: (+ цепь)РНК с ДНК в качестве промежуточного продукта в жизненном цикле.

В одном из вариантов осуществления лечения представляет собой лечение вируса иммунодефицита человека (HIV); вируса гепатита В (HBV); вируса гепатита С (HCV); папилломавируса человека (HPV); цитомегаловируса (CMV) или вируса Эпштейна-Барр (EBV); вируса герпеса человека 8 типа (HHV), ас-

социированного с саркомой Капоши; вируса Коксаки В3; вируса Борна; вируса гриппа.

Нарушения, подлежащие лечению - фиброзные нарушения

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение фиброзного нарушения (например, нарушения, характеризующегося избыточным фиброзом, например, избыточным фиброзом соединительной ткани в ткани или органе, например, вызванным репаративным или реактивным процессом, например, в ответ на повреждение (например, рубцевание, заживление) или избытка фиброзной ткани, возникающей из одной клеточной линии (например, фиброма)).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение:

для легких: фиброза легких; фиброза легких, вторичного по отношению к муковисцидозу; идиопатического фиброза легких; массивного прогрессивного фиброза работников угольной промышленности;

для печени: цирроза;

для сердца: эндомикардиального фиброза; перенесенного инфаркта миокарда; предсердного фиброза;

для средостения: фиброза средостения;

для кости: миелофиброза;

для брюшинного пространства: ретроперитонеального фиброза;

для кожи: нефрогенного системного фиброза; келоидного рубцевания; системного склероза; склеродермии;

для кишечника: болезни Крона;

для соединительной ткани: артрофиброза или капсулита.

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, облегчаемые ингибированием мутантного

BRAF

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения, например, рака), которое ассоциировано с мутантной формой RAF (например, BRAF), такой как, например, мутации, описанные в Davies et al., 2002; Wan et al., 2004; и Stratton et al., 2003.

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения, например, рака), которое облегчается путем ингибирования RAF (например, BRAF).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое характеризуется клетками, сверхэкспрессирующими мутантный RAF (например, BRAF) (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз).

Пролиферативные нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение злокачественной меланомы; рака ободочной и прямой кишки; метастатического рака ободочной и прямой кишки; фолликулярного рака щитовидной железы; инсулярного рака щитовидной железы; сосочкового рака щитовидной железы; карциномы яичников; карциномы яичников низкой степени злокачественности; немелкоклеточного рака легких; злокачественного ретикулоэндотелиоза; холангиокарциномы; глиомы низкой степени злокачественности у детей (например, пилоцитарная астроцитомы; ганглиоглиома; плеоморфная ксантоастроцитомы); множественной миеломы или медуллярного рака поджелудочной железы. В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение аденокарциномы протоков поджелудочной железы.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое ассоциировано с мутантной формой RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.), но которое устойчиво к лечению известным (например, утвержденным) ингибитором RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.). Примеры известных (например, утвержденных) ингибиторов BRAF включают вемурафениб (PLX4032, RG7204, зельбораф) (утвержден) и дабрафениб (GSK-2118436) (утвержден).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое ассоциировано с мутантной формой RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.), но которое устойчиво к лечению комбинацией известного (например, утвержденного) ингибитора RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.) и известного (например, утвержденного) ингибитора MEK. Примеры ингибиторов MEK включают траметиниб (GSK 1120212) (утвержден); селуметиниб (AZD6244) (в клинических испытаниях); PD 325901 (в клинических испытаниях); кобиметиниб (GDC 0973, XL 518) (в клинических испытаниях) и CI 1040 (PD184352) (в клинических испытаниях).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение BRAF-мутантной меланомы, естественным образом устойчивой к вемурафенибу; BRAF-мутантной меланомы, которая приобретает устойчивость к лечению вемурафенибом; BRAF-мутантной меланомы, естественным образом устойчивой к дабрафенибу; BRAF-мутантной меланомы, которая приобретает устойчивость к лечению

дабрафенибом; или BRAF-мутантной меланомы, которая приобретает устойчивость к комбинации ингибитора BRAF и ингибитора MEK (например, дабрафениба и траметиниба).

Другие нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение гистиоцитоза клеток Лангерганса (LCH) или болезни Эрдгейма-Честера.

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, облегчаемые одновременным ингибированием BRAF и CRAF

Формы рака, например, с активирующими мутациями RAS, RAF и EGFR или сверхэкспрессией RAS, RAF и EGFR, в том числе любой из их изоформ, могут быть особенно чувствительными к общему ингибированию RAF (например, CRAF и BRAF). Формы рака с другими аномалиями, ведущими к повышающей регуляции сигнала пути RAF-MEK-ERK, также могут быть особенно чувствительными к лечению ингибиторами общей активности RAF (например, CRAF и BRAF). Примеры таких аномалий включают конститутивную активацию рецептора фактора роста; сверхэкспрессию одного или нескольких рецепторов фактора роста; сверхэкспрессию одного или нескольких факторов роста; активацию опосредованного KSR пути и слияние генов BRAF или CRAF.

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения, например, рака), которое облегчается одновременным ингибированием BRAF и CRAF.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения, например, рака), которое характеризуется конститутивной активацией рецептора фактора роста; сверхэкспрессией одного или нескольких рецепторов фактора роста (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз); сверхэкспрессией одного или нескольких факторов роста (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз); и/или активирующим слиянием генов BRAF и/или CRAF.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения, например, рака), которое характеризуется одним, или несколькими, или всем из следующего:

- (a) активирующие мутанты RAS и/или RAF;
- (b) повышающая регуляция RAS и/или RAF;
- (c) повышающая регуляция сигналов пути RAF-MEK-ERK и
- (d) повышающая регуляция рецепторов фактора роста (например, ERBB2 и EGFR).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение воспалительного заболевания; инфекции; аутоиммунного нарушения; инсульта; ишемии; сердечного нарушения; неврологического нарушения; фиброгенного нарушения, пролиферативного нарушения; гиперпролиферативного нарушения; неракового гиперпролиферативного нарушения; опухоли; лейкоза; новообразования; рака; карциномы; метаболического заболевания; злокачественного заболевания; рестеноза сосудов; псориаза; атеросклероза; ревматоидного артрита; остеоартрита; сердечной недостаточности; хронической боли; невропатической боли; сухого глаза; закрытоугольной глаукомы или открытоугольной глаукомы.

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, ассоциированные с мутациями RAS и/или активацией пути MAPK

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое ассоциировано с мутацией RAS (например, KRAS, NRAS, HRAS) и/или активацией пути MAPK (например, гиперактивностью пути MAPK).

Пролиферативные нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение пролиферативного нарушения (например, рака), которое ассоциировано с мутацией RAS (например, KRAS, NRAS, HRAS) и/или активацией пути MAPK (например, гиперактивностью пути MAPK).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение немелкоклеточного рака легкого; рака ободочной и прямой кишки; метастатического рака ободочной и прямой кишки; гепатоцеллюлярной карциномы; аденокарциномы поджелудочной железы; злокачественной меланомы; гематологической злокачественной опухоли {например, ювенильного миеломоноцитарного лейкоза (JMML); хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML); миелодиспластического синдрома (MDS); острого лимфобластного лейкоза (ALL); множественной миеломы (MM); лимфомы Беркита; лимфомы Ходжкина); эпителиального рака яичников I типа; первичного перитонеального рака; аденокарциномы желчных протоков; фолликулярного рака щитовидной железы; недифференцированного сосочкового рака щитовидной железы; саркомы мягких тканей (например, ангиосаркомы; лейомиосаркомы; рабдомиосаркомы; миксомы; злокачественной фиброзной гистиоцитомы); нейрофиброматоза I типа (NF1); неоперабельных плексиформных нейрофибром (PN); увеальной меланомы; меланомы цилиарного тела; меланомы сосу-

дистой оболочки глаза; меланомы радужной оболочки глаза; метастатической внутриглазной меланомы; аденокарциномы; рака почки; семиномы; рака мочевого пузыря; рака эндометрия; рака шейки матки; нейробластомы; аденокарциномы желудка; плоскоклеточного рака головы и шеи или рака предстательной железы.

Другие нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение отторжения трансплантата (например, ксенотрансплантата; кожи; конечности; органа; костного мозга); остеоартрита; ревматоидного артрита; муковисцидоза; осложнений диабета (например, диабетической ретинопатии; диабетической нефропатии); гепатомегалии; кардиомегалии; синдрома Нунан; кардио-фацио-кожного синдрома; гипертрофической кардиомиопатии; инсульта (например, острого фокального ишемического инсульта; общей ишемии головного мозга); сердечной недостаточности; септического шока; астмы; хронической обструктивной болезни легких; болезни Альцгеймера; хронической боли (например, идиопатической боли; боли, ассоциированной с хроническим алкоголизмом, дефицитом витаминов, уреимией или гипотиреозом; хронической боли, ассоциированной с воспалением; хронической послеоперационной боли) или нейропатической боли (например, ассоциированной с воспалением; послеоперационной боли; фантомной боли; боли при ожогах; подагры; невралгии тройничного нерва; острой герпетической боли; постгерпетической боли; каузалгии; диабетической нейропатии; разрыва сплетения; нейромы; васкулита; вирусной инфекции; разможжения; компрессии; повреждения тканей; ампутации конечности; повреждения нерва между периферической нервной системой и центральной нервной системой).

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, облегчаемые ингибированием SRC

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое облегчается ингибированием SRC.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения), которое ассоциировано с мутацией SRC; сверхэкспрессией SRC (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз) или активацией SRC вышерасположенными компонентами пути (например, посредством повышенной передачи сигналов RTK).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение рака эндометрия; плоскоклеточного рака легкого; злокачественной мезотелиомы плевры; злокачественной меланомы; хронического миелоидного лейкоза (например, устойчивого к иматинибу); метастазов в кости; устойчивого к гормонам рака предстательной железы; рецидивирующего рака предстательной железы; рецидивирующей остеосаркомы; острого лимфобластного лейкоза; рака ободочной и прямой кишки; метастатического рака ободочной и прямой кишки; рака молочной железы; рака яичников; рецидивирующего или метастатического рака головы и шеи (например, метастатического плоскоклеточного рака шеи с первичным плоскоклеточным раком неизвестного происхождения; рецидивирующего метастатического плоскоклеточного рака шеи с первичным неизвестного происхождения, рецидивирующего плоскоклеточного рака гипотаринкса; рецидивирующего плоскоклеточного рака гортани, рецидивирующего плоскоклеточного рака губы и полости рта, рецидивирующего плоскоклеточного рака носоглотки; рецидивирующего плоскоклеточного рака ротоглотки; рецидивирующего плоскоклеточного рака параназального синуса и полости носа; рецидивирующего бородавчатого рака гортани; рецидивирующего бородавчатого рака полости рта; плоскоклеточного рака гортаноглотки, плоскоклеточного рака гортани, плоскоклеточного рака губы и полости рта, плоскоклеточного рака носоглотки, плоскоклеточного рака ротоглотки, плоскоклеточного рака придаточных пазух и полости носа; бородавчатого рака гортани; бородавчатого рака полости рта, рака языка); рецидивирующего рака кожи; плоскоклеточного рака кожи; острого миелоидного лейкоза; глиобластомы или врожденной диффузной глиомы варолиева моста.

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, облегчаемые ингибированием p38

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое облегчается ингибированием p38 (например, p38 α , p38 γ).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения), которое ассоциировано с мутацией p38 (например, p38 α , p38 γ); сверхэкспрессией p38 (например, p38 α , p38 γ) (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз); или активацией p38 (например, p38 α , p38 γ) вышерасположенными компонентами пути.

Пролиферативные нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение рака яичников; плоскоклеточного рака полости рта; множественной миеломы; новообразований костного мозга и миелодиспластического синдрома.

Другие нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение воспалительного нару-

шения, характеризующегося пролиферацией Т-клеток (например, активацией и ростом Т-клеток).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение ревматоидного артрита; остеоартрита; псориазического артрита; синдрома Рейтера; травматического артрита; артрита, обусловленного краснухой; острого синовита; подагрического артрита или спондилита.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение псориаза; экземы; аллергического ринита; аллергического конъюнктивита; астмы; респираторного дистресс-синдрома взрослых; острого повреждения легких (ALI); острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS); хронического воспаления легких; хронической обструктивной болезни легких; общей кахексии; гломерулонефрита; хронической сердечной недостаточности; атеросклероза; острого коронарного синдрома; ишемии сердца или инфаркта миокарда.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение эндотоксемии; синдрома токсического шока; воспалительного заболевания кишечника; атеросклероза; синдрома раздраженной толстой кишки; болезни Крона; неспецифического язвенного колита; резорбции костной ткани; остеопороза; диабета; повреждений, обусловленных реперфузией; реакции "трансплантат против хозяина"; отторжения аллотрансплантата; сепсиса; септического шока; эндотоксического шока; грамотрицательного сепсиса; гломерулонефрита; рестеноза или тромбоза.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение боли.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение хронической боли; нейромышечной боли; головной боли; боли, обусловленной раком; острой или хронической воспалительной боли, ассоциированной с остеоартритом или ревматоидным артритом; послеоперационной воспалительной боли; нейропатической боли; диабетической нейропатии; невралгии тройничного нерва; постгепатитной невралгии; воспалительной нейропатии; боли при мигрени; пояснично-крестцовой радикулопатии; зубной боли; травмы нерва или невралгической ишемии.

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, облегчаемые ингибированием FGFR1

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое облегчается ингибированием FGFR1.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения), которое ассоциировано с мутацией FGFR1; сверхэкспрессией FGFR1 (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз), или активацией FGFR1 выше-расположенными компонентами пути.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение рака молочной железы; плоскоклеточного рака легких; рака желудка; уротелиальной карциномы; множественной миеломы; 8p11-миелолипролиферативного синдрома или гепатоцеллюлярной карциномы.

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, облегчаемые ингибированием VEGFR-2 (KDR)

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое облегчается ингибированием VEGFR-2 (KDR).

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания) (например, пролиферативного нарушения), которое ассоциировано с мутацией VEGFR-2; сверхэкспрессией VEGFR-2 (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз); или активацией VEGFR-2 выше-расположенными компонентами пути.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое характеризуется повышенной выработкой VEGF (например, раковыми клетками или стромальными клетками).

Пролиферативные нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение рака поджелудочной железы; немелкоклеточного рака легких (NSCLC); новообразований яичника; перитонеальных новообразований; новообразований фаллопиевых труб; рака легких и ассоциированного плеврального выпота; рецидивирующего или метастатического плоскоклеточного рака головы и шеи; местнораспространенной носоглоточной карциномы; глиобластомы (например, мультиформной глиобластомы; гигантоклеточной глиобластомы); глиосаркомы; врожденной диффузной глиомы варолиевого моста; связанной с HIV саркомы Капоши; множественной миеломы; карциномы клеток почки; метастатической аденокарциномы желудка; острого миелоидного лейкоза (AML); гепатоцеллюлярной карциномы; дерматофибросаркомы; медуллярного рака щитовидной железы (МТС); сосочкового рака щитовидной железы; фолликулярного рака щитовидной железы; миелодиспластического синдрома; нейрофиброматоза 1 типа; плексиформной нейрофибромы; нейрофибромы спинного мозга; рака молочной железы; новообразований желчных протоков; рака шейки матки; рака предстательной железы; меланомы; рака мочевого пузыря; рака уретры; рака мочеточника; рака почки; рака почечной лоханки; саркомы; липосаркомы; рака ободочной (толстой)

кишки; остеосаркомы; синовиальной карциномы; нейробластомы или рабдомиосаркомы.

Другие нарушения

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение атеросклероза; ожирения; синдрома нейропатической боли; возрастной макулярной дегенерации; диабетической ретинопатии; диабетического макулярного отека или ревматоидного артрита.

Нарушения, подлежащие лечению - нарушения, облегчаемые ингибированием LCK

В одном из вариантов осуществления (например, для применения в способах терапии, применения в изготовлении лекарственных препаратов, в способах лечения) лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое облегчается ингибированием LCK.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение нарушения (например, заболевания), которое ассоциировано с мутацией LCK; сверхэкспрессией LCK (например, по сравнению с соответствующими нормальными клетками; например, где имеет место сверхэкспрессия в 1,5, 2, 3, 5, 10, 20 или 50 раз) или активацией LCK вышерасположенными компонентами пути.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение иммунологического заболевания или патологического состояния с участием иммунологического компонента.

В одном из вариантов осуществления лечение представляет собой лечение ревматоидного артрита; воспалительного заболевания кишечника (например, неспецифического язвенного колита; болезни Крона); псориаза; псориазического артрита; отторжения трансплантата ткани или органа (включая, например, профилактику); острой или хронической реакции "трансплантат против хозяина"; отторжения аллотрансплантата; отторжения ксенотрансплантата; аллергической астмы; множественного склероза; сахарного диабета 1 типа; фиброза легких или реакции гиперчувствительности кожи.

Лечение

Термин "лечение", используемый в данном документе в контексте лечения нарушения, в целом, относится к лечению человека или животного (например, в ветеринарных применениях), при котором достигается некоторый желательный терапевтический эффект, например, ингибирование прогрессирования заболевания, и включает снижение скорости прогрессирования, остановку скорости прогрессирования, облегчение симптомов нарушения, ослабление нарушения и излечение нарушения. Лечение в качестве профилактического средства (т.е. профилактики) также является включенным. Например, применение у пациентов, у которых еще не развилось нарушение, но которые имеют риск развития нарушения, охватывается термином "лечение".

Например, лечение включает профилактику рака, снижение заболеваемости раком, облегчение симптомов рака и т.д.

Выражение "терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, относится к такому количеству соединения или материала, композиции или лекарственной формы, содержащей соединение, которое является эффективным для получения некоторого желательного терапевтического эффекта, соизмеримого с приемлемым соотношением польза/риск при введении в соответствии с желаемой схемой лечения.

Комбинированные методы лечения

Термин "лечение" включает комбинированные обработки и методы лечения, в которых комбинируют два или более метода лечения, например, последовательно или одновременно. Например, соединения, описанные в данном документе, также могут использоваться в комбинированных методах лечения, например, совместно с другими средствами. Примеры обработок и методов лечения включают химиотерапию (введение активных средств, включая, например, лекарственные средства, антитела (например, в качестве иммунотерапии), пролекарства (например, как в фотодинамической терапии, GDEPT, ADEPT и т.д.); хирургическую операцию; лучевую терапию; фотодинамическую терапию, генную терапию и контролируемые диеты.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к соединению, описываемому в данном документе, в комбинации с одним или несколькими (например, 1, 2, 3, 4 и т.д.) дополнительными терапевтическими средствами, описываемыми ниже.

Конкретная комбинация останется на усмотрение врача, который будет выбирать дозировки с использованием своих общеизвестных знаний и режимов дозирования, известных квалифицированному специалисту.

Средства (т.е. соединение, описанное в данном документе, плюс одно или несколько других средств) могут вводиться одновременно или последовательно и могут вводиться в индивидуально меняющихся режимах дозирования и различными путями. Например, при последовательном введении средства могут вводиться с близко расположенными интервалами (например, в течение периода 5-10 мин) или с более длительными интервалами (например, через 1, 2, 3, 4 или более ч, или даже через более длительные периоды, при необходимости), при этом точный режим введения соизмеряется со свойствами терапевтического(терапевтических) средства(средств).

Средства (т.е. соединение, описанное в данном документе, плюс одно или несколько других средств) могут составляться в одной лекарственной форме или, в качестве альтернативы, индивидуальные средства могут составляться отдельно и предоставляться совместно в форме набора, необязательно с

инструкциями по их применению.

Примеры дополнительных средств/методов лечения, которые могут совместно вводиться/комбинироваться с лечением соединениями ТВАР, описанными в данном документе, включают следующее: антиметаболиты; алкилирующие средства; веретенные яды; ингибиторы топоизомераз; ДНК-связывающие средства; ингибиторы киназ; терапевтические антитела; ингибиторы PARP; ингибиторы метаболизма NAD; метаболические ингибиторы; направленные средства; эндокринные средства и т.д.

Другие применения

Соединения ТВАР, описанные в данном документе, также могут использоваться в качестве добавок к клеточной культуре для ингибирования RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.).

Соединения ТВАР, описанные в данном документе, также могут использоваться как часть анализа *in vitro*, например для того, чтобы определить, получит ли хозяин-кандидат пользу от лечения соединением, о котором идет речь.

Соединения ТВАР, описанные в данном документе, также могут использоваться в качестве стандарта, например, в анализе для того, чтобы идентифицировать другие активные соединения, другие ингибиторы RAF (например, BRAF, CRAF и т.д.) и т.д.

Наборы

Один из аспектов настоящего изобретения относится к набору, содержащему (а) соединение ТВАР, описываемое в данном документе, или композицию, содержащую соединение ТВАР, описываемое в данном документе, например, предпочтительно обеспеченное в подходящем контейнере и/или с подходящей упаковкой; и (б) инструкции для применения, например, письменные инструкции о том, как вводить соединение или композицию.

Письменные инструкции также могут включать перечень показаний, для которых активный ингредиент является подходящим методом лечения.

Пути введения

Соединение ТВАР или фармацевтическая композиция, содержащая соединение ТВАР, может вводиться субъекту с помощью любого подходящего пути введения, либо системного/периферического, либо местного (т.е. в месте желательного действия).

Примеры путей введения включают пероральный (например, при приеме внутрь); трансбуккальный; подязычный; трансдермальный (в том числе, например, с помощью пластыря, лейкопластыря и т.д.); чресслизистый (в том числе, например, с помощью пластыря, лейкопластыря и т.д.); интраназальный (например, с помощью назального спрея); глазной (например, с помощью глазных капель); легочный (например, с помощью ингаляционной или инсуффляционной терапии с использованием, например, аэрозоля, например, через рот или нос); ректальный (например, с помощью суппозитория или клизмы); вагинальный (например, с помощью вагинального суппозитория); парентеральный, например, путем инъекции, в том числе подкожной, интрадермальной, внутримышечной, внутривенной, внутриартериальной, внутрисердечной, интратекальной, интраспинальной, интракапсулярной, подкапсулярной, интраорбитальной, внутрибрюшинной, внутритрахеальной, внутрикожной, внутрисуставной, субарахноидальной и надчревной; путем имплантации депо или резервуара, например, подкожно или внутримышечно.

Субъект/пациент

Субъект/пациент может быть хордовым, позвоночным, млекопитающим, плацентарным млекопитающим, сумчатым (например, кенгуру, вомбат), грызуном (например, морская свинка, хомячок, крыса, мышь), мышевидным грызуном (например, мышь), зайцеобразным (например, кролик), представителем птиц (например, птица), псовым (например, собака), представителем кошек (например, кошка), представителем лошадей (например, конь), представителем свиней (например, свинья), представителем овец (например, овца), крупным рогатым скотом (например, корова), приматом, обезьяной (например, мартышка или обезьяна), мартышкой (например, мармозетка, бабуин), человекообразной обезьяной (например, горилла, шимпанзе, орангутан, гиббон) или человеком.

Кроме того, субъект/пациент может являться любой из его форм развития, например, плодом. В одном из предпочтительных вариантов осуществления субъект/пациент является человеком. Составы

Хотя соединение ТВАР можно вводить отдельно, предпочтительно представить его в виде фармацевтического состава (например, композиции, препарата, лекарственного препарата), содержащего по меньшей мере одно соединение ТВАР, описываемое в данном документе, вместе с одним или несколькими другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области, включая фармацевтически приемлемые носители, разбавители, вспомогательные вещества, вспомогательные средства, наполнители, буферы, консерванты, антиоксиданты, смазывающие вещества, стабилизаторы, солибилизаторы, поверхностно-активные вещества (например, смачивающие средства), маскирующие средства, красители, средства для придания вкуса и аромата и подсластители. Состав может дополнительно содержать другие активные средства, например, другие терапевтические или профилактические средства.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтические композиции, определяемые выше, и способы изготовления фармацевтической композиции, включающие сме-

шивание по меньшей мере одного соединения ТВАР, описываемого в данном документе, вместе с одним или несколькими другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области, например носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и т.д. При составлении в виде отдельных единиц (например, таблеток и т.д.) каждая единица содержит заранее определенное количество (дозу) соединения.

Выражение "фармацевтически приемлемый", используемое в данном документе, относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т.д., которые, в рамках обоснованного медицинского заключения, подходят для применения в контакте с тканями субъекта, о котором идет речь (например, человека), без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с приемлемым соотношением польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и т.д. также должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава.

Подходящие носители, разбавители, вспомогательные вещества и т.д. можно найти в стандартных работах по фармации, например, Remington's Pharmaceutical Sciences. 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990 и Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th edition, 2005.

Составы могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Такие способы включают этап приведения соединения в контакт с носителем, который образован одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. В целом, составы получают путем равномерного и тщательного объединения соединения с носителями (например, жидкими носителями, тонко измельченным твердым носителем и т.д.) и затем формования продукта, если это необходимо.

Состав может быть получен для обеспечения быстрого или медленного высвобождения; немедленного, отсроченного, регулируемого во времени или замедленного высвобождения или их комбинации.

Составы могут соответствующим образом находиться в форме жидкостей, растворов (например, водных, неводных), суспензий (например, водных, неводных), эмульсий (например, "масло в воде", "вода в масле"), эликсиров, сиропов, электуариев, жидкостей для полоскания рта, капель, таблеток (в том числе, например, таблеток, покрытых оболочкой), гранул, порошков, таблеток для рассасывания, пастилок, капсул (в том числе, например, твердых и мягких желатиновых капсул), облаток, пилюль, ампул, болюсов, суппозиториев, вагинальных суппозиториев, настоек, гелей, паст, мазей, кремов, лосьонов, масел, пен, спреев, взвесей или аэрозолей.

Составы могут соответствующим образом быть предоставлены в виде пластыря, лейкопластыря, перевязочного материала, повязки или тому подобного, пропитанного одним или несколькими соединениями и необязательно одним или несколькими другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, в том числе, например, усилителями проникновения, пропитывания и поглощения. Составы также могут соответствующим образом быть предоставлены в форме депо или резервуара.

Соединение может быть растворено, суспензировано или смешано с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми ингредиентами. Соединение может быть предоставлено в липосоме или другой микрочастице, которая предназначена для нацеливания соединения, например, на компоненты крови или один или несколько органов.

Составы, пригодные для перорального введения (например, при приеме внутрь), включают жидкости, растворы (например, водные, неводные), суспензии (например, водные, неводные), эмульсии (например, "масло в воде", "вода в масле"), эликсиры, сиропы, электуарии, таблетки, гранулы, порошки, капсулы, облатки, пилюли, ампулы, болюсы.

Составы, пригодные для трансбуккального введения, включают в себя жидкости для полоскания рта, таблетки для рассасывания, пастилки, а также пластыри, лейкопластыри, депо и резервуары. Таблетки для рассасывания обычно содержат соединение в ароматизированной основе, обычно в сахарозе и гуммиарабике или трагаканте. Пастилки обычно содержат соединение в инертной матрице, такой как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик. Жидкости для полоскания рта обычно содержат соединение в подходящем жидком носителе.

Составы, подходящие для подъязычного введения, включают таблетки, таблетки для рассасывания, пастилки, капсулы и пилюли.

Составы, пригодные для перорального чресслизистого введения, включают в себя жидкости, растворы (например, водные, неводные), суспензии (например, водные, неводные), эмульсии (например, "масло в воде", "вода в масле"), жидкости для полоскания рта, таблетки для рассасывания, пастилки, а также пластыри, лейкопластыри, депо и резервуары.

Составы, пригодные для неперорального чресслизистого введения, включают в себя жидкости, растворы (например, водные, неводные), суспензии (например, водные, неводные), эмульсии (например, "масло в воде", "вода в масле"), суппозитории, вагинальные суппозитории, гели, пасты, мази, кремы, лосьоны, масла, а также пластыри, лейкопластыри, депо и резервуары.

Составы, пригодные для трансдермального введения, включают гели, пасты, мази, кремы, лосьоны и масла, а также пластыри, лейкопластыри, перевязочные материалы, повязки, депо и резервуары.

Таблетки могут быть изготовлены обычными способами, например прессованием или формованием, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки

могут быть получены прессованием в соответствующей машине соединения в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы необязательно в смеси с одним или несколькими связующими веществами (например, повидон, желатин, гуммиарабик, сорбит, трагакант, гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнителями или разбавителями (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, вторичный кислый фосфат кальция); смазывающими веществами (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния); средствами для улучшения распада (например, натрия крахмалгликолят, поперечно-сшитый повидон, поперечно-сшитая карбоксиметилцеллюлоза натрия); поверхностно-активными или диспергирующими или смачивающими средствами (например, лаурилсульфат натрия); консервантами (например, метил-п-гидроксибензоат, пропил-п-гидроксибензоат, сорбиновая кислота); вкусоароматическими веществами, усилителями вкуса и аромата и подсластителями. Формованные таблетки могут быть изготовлены в соответствующей машине формованием смеси порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем. Таблетки необязательно могут быть покрыты оболочкой или быть с риской и могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение соединения в них с помощью, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения желаемого профиля высвобождения. Таблетки необязательно могут быть снабжены покрытием, например, для влияния на высвобождение, например энтеросолюбильным покрытием для обеспечения высвобождения в частях кишечника помимо желудка.

Мази, как правило, получают из соединения и парафиновой или смешивающейся с водой основной мази.

Кремы, как правило, получают из соединения и кремовой основы "масло в воде". При желании, водная фаза кремовой основы может включать, например, по меньшей мере приблизительно 30% вес./вес., многоатомного спирта, т.е. спирта, имеющего две или более гидроксильные группы, такого как пропиленгликоль, бутан-1,3-диол, маннит, сорбит, глицерин и полиэтиленгликоль и их смеси. Составы для местного применения могут по желанию включать соединение, которое увеличивает поглощение и проникновение соединения через кожу или другие пораженные участки. Примеры таких усилителей кожного проникновения включают диметилсульфоксид и родственные аналоги.

Эмульсии, как правило, получают из соединения и масляной фазы, которая необязательно может содержать только эмульгатор (иначе известный как эмульгирующее вещество), или она может содержать смесь по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом или как с жиром, так и с маслом. Предпочтительно, гидрофильный эмульгатор включается вместе с липофильным эмульгатором, который действует в качестве стабилизатора. Также предпочтительно включать как масло, так и жир. Вместе эмульгатор(эмульгаторы) со стабилизатором(стабилизаторами) или без него(них) образуют так называемый эмульгирующий воск, а воск вместе с маслом и/или жиром образуют так называемую эмульгирующую основу мази, которая образует масляную дисперсную фазу в кремовых составах.

Подходящие эмульгаторы и стабилизаторы эмульсии включают Tween 60, Span 80, цетостеариловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат и лаурилсульфат натрия. Выбор подходящих масел или жиров для состава основан на достижении желательных косметических свойств, поскольку растворимость соединения в большинстве масел, которые будут использоваться в эмульсионных фармацевтических составах, может быть очень низкой. Таким образом, крем предпочтительно должен быть нежирным, не оставляющим пятен и стирающимся продуктом с подходящей консистенцией во избежание утечки из тюбиков или других контейнеров. Могут быть использованы с прямой или разветвленной цепью, моно- или двухосновные алкиловые сложные эфиры, такие как диизоадипат, изоцетилстеарат, пропиленгликолевый двухзамещенный сложный эфир жирных кислот кокосового масла, изопропилмири-стат, децилолеат, изопропилпальмитат, бутилстеарат, 2-этилгексилпальмитат или смесь сложных эфиров с разветвленной цепью, известная как Crodamol CAP, при этом последние три являются предпочтительными сложными эфирами. Они могут использоваться по отдельности или в комбинации в зависимости от требуемых свойств. В качестве альтернативы, могут использоваться липиды с высокой температурой плавления, такие как белый мягкий парафин и/или жидкий парафин или другие минеральные масла.

Составы, пригодные для интраназального введения, где носитель представляет собой жидкость, включают, например, назальный спрей, капли в нос или аэрозольное введение с помощью небулайзера, а также включают водные или масляные растворы соединения.

Составы, пригодные для интраназального введения, где носитель представляет собой твердое вещество, включают в себя, например, те, которые представлены в виде крупного порошка, имеющего размер частиц, например, в диапазоне от приблизительно 20 до приблизительно 500 мкм, который вводят способом, которым принимают лекарства для вдыхания через нос, т.е. путем быстрого вдоха через носовой проход из контейнера с порошком, подносимого близко к носу.

Составы, пригодные для легочного введения (например, путем ингаляционной или инсуффляционной терапии), включают те, которые представлены в виде аэрозольного спрея из упаковки под давлением с применением подходящего пропеллента, такого как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другие подходящие газы.

Составы, пригодные для глазного введения, включают глазные капли, в которых соединение растворено или суспензировано в пригодном носителе, особенно в водном растворителе для соединения.

Составы, пригодные для ректального введения, могут быть представлены в виде суппозитория с подходящей основой, содержащей, например, природные или отвержденные масла, воски, жиры, полужидкие или жидкие полиолы, например, масло какао или салицилат; или в виде раствора или суспензии для лечения с помощью клизмы.

Составы, пригодные для вагинального введения, могут быть представлены в виде вагинальных суппозитория, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих в дополнение к соединению такие носители, которые известны в данной области как пригодные.

Составы, пригодные для парентерального введения (например, путем инъекции), включают в себя водные или неводные, изотонические, апирогенные, стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых соединение растворено, суспендировано или иным образом предоставлено (например, в липосоме или другой микрочастице). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизаторы, бактериостатические средства, суспендирующие средства, загустители и растворенные вещества, которые делают препарат изотоничным крови (или другой соответствующей биологической жидкости) назначенного реципиента. Примеры наполнителей включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин, растительные масла и тому подобное. Примеры подходящих изотонических носителей для применения в таких составах включают физиологический раствор для инъекций, раствор Рингера или раствор Рингера с лактатом для инъекций. Как правило, концентрация соединения в жидкости составляет от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, например, от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл. Составы могут быть представлены в однодозовых или в многодозовых герметизированных контейнерах, например в ампулах и флаконах, и могут храниться в высушенном замораживании (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекции, непосредственно перед применением. Растворы и суспензии для инъекций для немедленного приема могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Дозировка

Специалисту в данной области будет понятно, что соответствующие дозировки соединений ТВАР, а также композиций, содержащих соединения ТВАР, могут варьировать для разных пациентов. Определение оптимальной дозы будет, как правило, включать балансирование уровня терапевтической пользы с каким-либо риском или вредными побочными эффектами. Выбранный уровень дозы будет зависеть от множества факторов, включающих активность конкретного соединения ТВАР, путь введения, время введения, скорость выведения соединения ТВАР, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации, тяжесть заболевания, а также вид, пол, возраст, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента. Количество соединения ТВАР и путь введения в конечном счете останутся на усмотрение врача, ветеринара или клинициста, хотя, как правило, доза будет выбираться для достижения локальных концентраций в месте действия, которые достигают желаемого эффекта, не вызывая существенных опасных или вредных побочных эффектов.

Введение может осуществляться в одной дозе, непрерывно или периодически (например, в виде отдельных доз через определенные промежутки времени) на протяжении всего курса лечения. Способы определения наиболее эффективных средств и дозировки для введения хорошо известны специалистам в данной области и будут изменяться в зависимости от используемого для лечения состава, цели лечения, клетки-мишени (клеток-мишеней), подлежащей лечению, и субъекта, подлежащего лечению. Разовые или многократные введения могут осуществляться с уровнем дозы и схемой, выбираемыми лечащим врачом, ветеринаром или клиницистом.

В целом, подходящая доза соединения ТВАР находится в диапазоне от приблизительно 10 мкг до приблизительно 250 мг (более типично, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 25 мг) на килограмм массы тела пациента в день. Если соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство или тому подобное, количество вводимого препарата рассчитывается на основе исходного соединения, и, таким образом, фактический вес для использования увеличивается пропорционально.

Химический синтез

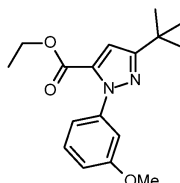
Все исходные материалы, реактивы и растворители для реакций относились к классу чистых для анализа и использовались в приобретенном виде. Хроматографические растворители относились к классу для HPLC и использовались без дополнительной очистки. Реакции контролировали с помощью анализа тонкослойной хроматографии (TLC) с использованием пластинок для тонкослойной хроматографии из силикагеля Merck 60 F-254. Колоночную флэш-хроматографию проводили на силикагеле Merck 60 (0,015-0,040 мм) или в одноразовых колонках с силикагелем Isolute Flash Si и Si II. Анализы LCMS выполняли на системе HPLC Micromass LCT/Water's Alliance 2795 с колонкой Discovery 5 мкм, C18, с i.d.(внутренний диаметр) 50 мм x 4,6 мм от Supelco при температуре 22°C с использованием следующей системы растворителей: растворитель А: метанол; растворитель В: 0,1% муравьиная кислота в воде при скорости потока 1 мл/мин. Градиент начинается с 10% А/90% В (по объему) от 0-0,5 мин, затем с 10% А/90% В до 90% А/10% В от 0,5 до 6,5 мин и продолжается при 90% А/10% В до 10 мин. После 10-10,5 мин градиент возвращался назад до 10% А/90%, где концентрация сохранялась до 12 мин. УФ-

детектирование проводили при 254 нм, и ионизация представляла собой электрораспыление с положительным или отрицательным ионом. Диапазон сканирования молекулярного веса составляет 50-1000. Образцы поставлялись в виде 1 мг/мл в DMSO или метаноле с введением 3 мкл при неполном заполнении петли. ЯМР-спектры регистрировали в DMSO-d₆ на спектрометре Bruker Advance 500 МГц.

Часть (I): N-арилрование пиразолкарбоксилатных сложных эфиров

Способ А. Этил, 3-трет-бутил-1Н-пиразол-5-карбоксилат (1 экв.), желаемую бороновую кислоту (2 экв.), ацетат меди (II) (1,5 экв.) и сухой DMF добавляли при перемешивании с получением голубого раствора. Добавляли сухой пиридин (2 экв.), после которого цвет стал зеленым, а затем ложку высушенных в сушильном шкафу порошкообразных 4 А (0,4 нм) молекулярных сит. Смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона до полного завершения реакции, подтверждаемого с помощью LC-MS. После завершения реакции смесь разбавляли раствором AcOEt и NH₄Cl. Органическую фазу выделяли, промывали раствором NH₄Cl, насыщ. водн. NaHCO₃, сушили (MgSO₄ со смолой с захваченной медью), фильтровали и выпаривали с получением маслянистого вещества, которое в некоторых случаях дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии.

Синтез 1. Этил, 3-трет-бутил-1-(3-метоксифенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилат

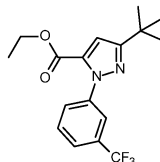


Способ А применяли с использованием этил 3-трет-бутил-1Н-пиразол-5-карбоксилата (320 мг, 1,631 ммоль) и 3-метоксифенилбороновой кислоты (307 мг, 2,020 ммоль). Реакцию завершили после перемешивания при комнатной температуре в течение 22 ч. После обработки полученное желтое масло растворяли в смеси DCM/гексан и наносили на колонку 50 г SNAP, которую элюировали 2 → 20% (по объему) EtOAc в гексане. Титульное соединение получали в виде бесцветного масла.

Выход: 462 мг (94%, чистота 92%).

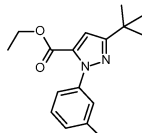
¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Гц): 1,17 (t, 3H, ³J_{HH}=7,1, CH₃), 1,30 (s, 9H, трет-Bu), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 4,17 (q, 2H, ³J_{HH}=7,1, OCH₂CH₃), 6,98 (m, 4H, ArH), 7,36 (t, 1H, ³J_{HH}=8,1, ArH). LC-MS (2,79 мин.): m/z расчет. для C₁₇H₂₂N₂O₃[M+H]⁺: 303,1; обнаруженное: 303,2.

Синтез 2. Этил, 3-трет-бутил-1-(3-трифторметилфенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилат



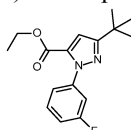
Способ А применяли с использованием этил, 3-трет-бутилпиразол-5-карбоксилата (320 мг, 1,60 ммоль) и 3-трифторметилфенилбороновой кислоты (307 мг, 1,60 ммоль). Через 20 ч реакционную смесь разбавляли с AcOEt (20 мл), промывали 2 × 20 мл воды, NaHCO₃ (20 мл, конц.) и, наконец, 20 мл соляного раствора. Органический слой сушили (MgSO₄) и выпаривали досуха с получением масла (417 мг). Соединение использовали для последующего этапа гидролиза без дополнительной очистки.

Синтез 3. Этил, 3-трет-бутил-1-(3-метилфенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилат



Способ А применяли с использованием этил, 3-трет-бутилпиразол-5-карбоксилата (320 мг, 1,60 ммоль) и 3-метилфенилбороновой кислоты (218 мг, 1,60 ммоль). Через 20 ч реакционную смесь разбавляли AcOEt (20 мл), промывали 2 × 20 мл воды, NaHCO₃ (20 мл, конц.) и, наконец, 20 мл соляного раствора. Органический слой сушили (MgSO₄) и выпаривали досуха с получением масла (466 мг). Соединение использовали в последующем этапе гидролиза без дополнительной очистки.

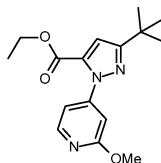
Синтез 4. Этил, 3-трет-бутил-1-(3-фторфенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилат



Способ А использовали с этил, 3-трет-бутилпиразол-5-карбоксилатом (320 мг, 1,60 ммоль) и 3-фторфенилбороновой кислотой (224 мг, 1,60 ммоль). Через 20 ч реакционную смесь разбавляли AcOEt (20 мл), промывали 2 × 20 мл воды, NaHCO₃ (20 мл, конц.) и, наконец, 20 мл соляного раствора. Органи-

ческий слой сушили ($MgSO_4$) и выпаривали досуха с получением масла (463 мг). Соединение использовали в последующем этапе гидролиза без дополнительной очистки.

Синтез 5. Этил, 3-трет-бутил-1-(2-метоксипиридин-4-ил)-1Н-пиразол-5-карбоксилат



Способ А использовали с этил, 3-трет-бутилпиразол-5-карбоксилатом (202 мг, 1,03 ммоль) и 2-метоксипиридин-4-ил бороновой кислотой (208 мг, 1,360 ммоль). Очистка с использованием 2 → 50% (по объему) EtOAc в гексане давала титульное соединение в виде бесцветного масла.

Выход: 243 мг (59%).

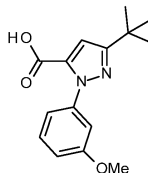
1H -ЯМР ($DMSO-d_6$), δ (ppm), J (Гц): 1,22 (t, 3H, $^3J_{HH}=7,1$, CH_3), 1,29 (s, 9H, трет-Bu), 3,90 (s, 3H, OCH_3), 4,23 (q, 2H, $^3J_{HH}=7,1$, OCH_2CH_3), 6,94 (d, 1H, $^3J_{HH}=1,7$, PyrH), 7,07 (s, 1H, ArH), 7,13 (dd, 1H, $^3J_{HH}=5,6$, 1,7, PyrH), 8,23 (d, 1H, $^3J_{HH}=5,6$, PyrH). LC-MS (2,83 мин.): m/z расчет. для $C_{16}H_{21}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 304,1; обнаруженное: 303,1.

Часть (II): гидролиз сложного этилового эфира

Способ В. Соответствующий 1-замещенный этил, 3-трет-бутил-1Н-пиразол-5-карбоксилат (1 экв.) растворяли в 4: 1: 1 смеси THF/MeOH/ H_2O , добавляли моногидрат гидроксида лития (1,1 экв.) и бесцветную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Летучие вещества впоследствии выпаривали, полученное твердое вещество повторно растворяли в H_2O и pH раствора доводили до 1 с помощью 10% водного раствора HCl. Полученную смесь молочного цвета экстрагировали EtOAc два раза и объединенную органическую фракцию промывали соляным раствором, сушили и концентрировали досуха с получением белого кристаллического твердого вещества.

Способ С. Соответствующий 1-замещенный этил, 3-третбутилпиразол-5-карбоксилат (1 экв.) кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин в 10 мл EtOH и 3 мл раствора NaOH (2 М). После охлаждения при комнатной температуре реакционную смесь нейтрализовали до pH 4,0 ($AcOH$), разбавляли 20 мл воды и экстрагировали AcOEt. Органический слой промывали 2 × 20 мл воды, сушили ($MgSO_4$) и выпаривали досуха, а остаток, полученный таким образом, очищали с помощью системы Biotage Isolera.

Синтез 6. 3-трет-Бутил-1-(3-метоксифенил)-1Н-пиразол-5-карбоновая кислота

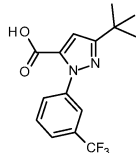


С применением способа В с использованием этил, 3-трет-бутил-1-(4-метоксифенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилата (442 мг, 1,345 ммоль) получали титульное соединение в виде белых кристаллов.

Выход: 300 мг (81%).

1H -ЯМР ($DMSO-d_6$), δ (ppm), J (Гц): 1,29 (s, 9H, трет-Bu), 3,78 (s, 3H, OCH_3), 6,90 (s, 1H, ArH), 6,97 (m, 4H, ArH), 7,35 (t, 1H, $^3J_{HH}=8,1$, ArH), 13,14 (s, 1H, COOR). LC-MS (2,51 мин.): m/z расчет. для $C_{15}H_{18}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 275,1; обнаруженное: 275,0.

Синтез 7. 3-трет-Бутил-1-(3-трифторметилфенил)-1Н-пиразол-5-карбоновая кислота

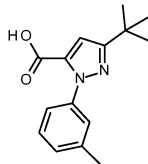


С применением способа С с использованием неочищенного этил, 3-трет-бутил-1-(3-трифторметилфенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилата (471 мг) получали твердый продукт, который передавали для дальнейшей очистки с помощью системы Biotage Isolera и смеси циклогексан:EtOAc 1:1 в качестве элюента (в изократическом режиме), и получали титульное соединение.

Выход: 133 мг (26,6% за 2 этапа).

1H ЯМР ($DMSO$), δ_H (ppm), J (Гц): 1,31 (s, 9H, $(CH_3)_3C$), 6,99 (s, 1H, Pyr-H), 7,70 (t, 1H, Arom- H_5 , $J=7,7$ Гц), 7,76-7,82 (m, 3H, Arom- H_{2+4+6}), 13,32 (s, 1H, Pyr- CO_2H) Факт. масса: ($C_{15}H_{16}F_3N_2O_2$) расчет. 313,1157, обнаруженная 313,1155.

Синтез 8. 3-трет-Бутил-бутил-1-(3-метилфенил)-1Н-пиразол-5-карбоновая кислота

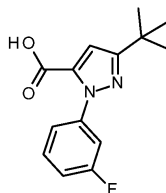


Титульное соединение получали с применением способа С с использованием неочищенного этил, 3-трет-бутил-1-(3-метилфенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилата (460 мг) после очистки с помощью системы Biotage Isolera и смеси циклогексан:EtOAc 1:1 в качестве элюента (в изократическом режиме).

Выход: 101 мг (24,% за 2 этапа).

¹H ЯМР (DMSO), δ_{H} (ppm), J (Гц): 1,29 (s, 9H, (CH₃)₃C), 2,35 (s, 3H, 3-CH₃), 6,89 (s, 1H, Pyg-H), 7,18 (d, 1H, Arom-H₂, J=7,2 Гц), 7,20-7,24 (m, 2H, Arom-H₄₊₆), 7,32 (t, 1H, Arom-H₅, J=7,3 Гц), 13,09 (s, 1H, Pyg-CO₂H). Факт, масса: (C₁₅H₁₈N₂O₂) расчет. 258,1368, обнаруженная 258,1373.

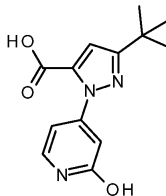
Синтез 9. 3-трет-Бутил-1-(3-фторфенил)-1Н-пиразол-5-карбоновая кислота



Титульное соединение получали с применением способа С с использованием неочищенного этил, 3-трет-бутил-1-(3-фторфенил)-1Н-пиразол-5-карбоксилата (463 мг). См., например, Springer et al., 2011.

Выход 166 мг (39,6% за 2 этапа). ¹H ЯМР (DMSO), δ_{H} (ppm), J (Гц): 1,29 (s, 9H, (CH₃)₃C), 6,95 (s, 1H, Pyg-H), 7,23-7,30 (m, 2H, Arom-H₄₊₅), 7,35 (d, 1H, Arom-H₂, J=9,8 Гц), 7,44-7,53 (m, 1H, Arom-H₆), 13,24 (s, 1H, Pyg-CO₂H). Факт. масса: (C₁₄H₁₅FN₂O₂) расчет. 262,1118, обнаруженная 262,1117.

Синтез 10. Гидрохлорид 3-трет-бутил-1-(2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-ил)-1Н-пиразол-5-карбоновой кислоты



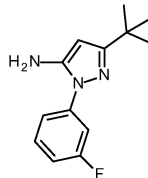
Способ D. Этил, 3-трет-бутил-1-(2-метоксипиридин-4-ил)-1Н-пиразол-5-карбоксилат (110 мг, 0,363 ммоль) растворяли в 6M HCl в H₂O (4,5 мл, 27,00 ммоль) и бесцветный раствор нагревали до 90°C в течение 48 ч. Все летучие вещества затем выпаривали и полученное бесцветное масло совместно выпаривали с DCM (10 мл), а затем с Et₂O (10 мл), что приводило к получению титульного соединения в виде белого твердого вещества.

Выход: 93 мг (98%).

¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Гц): 1,28 (s, 9H, tert-Bu), 6,32 (d, 1H, J=1,9, ArH), 6,37 (dd, 1H, J=7,1, 1,9, ArH), 6,99 (s, 1H, ArH), 7,46 (d, 1H, J=7,1, ArH). LC-MS (2,14 мин.): m/z расчет. для C₁₃H₁₆N₃O₃[M-Cl]⁺: 262,1; обнаруженное: 262,0;

Часть (III): образование 5-аминопиразолов

Синтез 11. 3-(трет-Бутил)-1-(3-фторфенил)-1Н-пиразол-5-амин

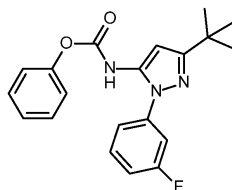


Способ E: Смесь 4,4-диметил-3-оксопентаннитрила (77 г, 0,62 моль) и 3-фторфенилгидразингидрохлорида (100 г, 0,62 моль) добавляли к толуолу (1 л) и нагревали до 100°C в течение 24 ч, после чего реакционную смесь оставляли охлаждаться до 20°C. Смесь фильтровали, промывали толуолом (2 × 250 мл) и высушивали. Неочищенную соль HCl объединили с предыдущей партией (выполненной с использованием 180 г 3-фторфенилгидразингидрохлорида и 234 г 3-фторфенилгидразингидрохлорида) и разделяли между DCM (4 л) и насыщ. водн. NaHCO₃ (4 л). Смесь перемешивали до тех пор, пока не оставалось никакого твердого вещества. Слой DCM отделяли, сушили (MgSO₄), фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением титульного соединения в виде оранжевого твердого вещества (210 г) с выходом 52%. Чистота >95% (в расчете на моли) согласно ЯМР и 94,4% (в

расчете на моли) согласно LCMS.

Часть (IV): образование 5-аминопиразолкарбаматов

Синтез 12. Фенил N-[3-трет-бутил-1-(3-фторфенил)-1H-пиразол-5-ил]карбамат

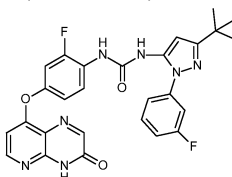


Способ F. 3-(Трет-бутил)-1-(3-фторфенил)-1H-пиразол-5-амин (210 г, 0,90 моль) растворяли в THF (5 л) при 0°C перед добавлением пиридина (146 мл, 1,80 моль). Фенилхлорформиат (113 мл, 0,90 моль) в THF (300 мл) загружали по каплям при 0-5°C в течение 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин и затем оставляли нагреваться до комнатной температуры. Через 4 ч HPLC показала, что осталось 8% продукта 1-й стадии.

Добавили дополнительную загрузку фенилхлорформиата (11 мл, 0,088 моль) и через 30 минут анализ HPLC показал, что реакция завершена. Загружали EtOAc (5 л) и органический слой промывали с 1 М HCl (2 x 1,2 л), водой (1,2 л), насыщ. водн. NaHCO₃ (1,2 л) и насыщ. соляным раствором (1,2 л). Органический слой сушили (MgSO₄), фильтровали и концентрировали под вакуумом. Неочищенное масло переносили в 1 : 3 смесь EtOAc/гептан и концентрировали под вакуумом с получением твердого вещества. Обеспечивали образование взвеси твердого вещества в гептане (2,5 л) в течение 1 ч, фильтровали и промывали гептаном (200 мл). Материал сушили при 40°C в течение ночи с получением титульного соединения (286 г) с выходом 90%. Чистота >95% согласно ЯМР.

Часть (V): связывание арилпиразольного и 4-аминофенокси-пиридопиразиного фрагментов с образованием мочевиного линкера

Синтез 13. 1-[3-трет-Бутил-1-(3-фторфенил)-1H-пиразол-5-ил]-3-[2-фтор-4(3-оксо-3,4-дигидропиридо[2,3-b]пиразин-8-илокси)фенил]мочевина (ТВАР-001)



Способ G. 81 мг (0,31 ммоль) 3-трет-бутил-1-(3-фторфенил)пиразол-5-карбоновой кислоты растворяли в 2 мл DMF во вращающейся пробирке при перемешивании и в инертной атмосфере. Затем добавляли 0,044 мл (0,32 ммоль) триэтиламина и 0,067 мл (0,032 ммоль) DPPA и перемешивание продолжали в течение 30 мин при 0°C и в течение дополнительного 1 ч при комнатной температуре. К этой реакционной смеси сразу добавляли 4-(3-фтор-4-аминофенил)пиридин-[2,3-b]пиразин-2-он (40 мг, 0,15 ммоль) (см., например, Zambon et al., 2010) и пробирки с реакционной смесью нагревали при 100°C в течение 30 мин при перемешивании и в атмосфере аргона. После охлаждения при комнатной температуре раствор разбавляли 10 мл AcOEt. Органический слой промывали 2 x 10 мл насыщенного соляного раствора, сушили (MgSO₄) и выпаривали досуха. Полученный таким образом остаток растирали с Et₂O и фильтровали с получением титульного соединения в виде бледно-коричневого аморфного твердого вещества.

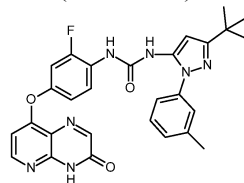
Выход: 66 мг (83,0%).

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ: 1,29 (s, 9H, t-Bu), 6,41 (s, 1H, H_{пиразол}), 6,64 (d, 1H, H_{руг}, J=5,6 Гц), 7,02-7,07 (m, 1H, H_{центральный атом}), 7,22-7,30 (m, 2H, H_{атом пиразола}), 7,40-7,44 (m, 2H, H_{центральный атом} + H_{атом пиразола}), 7,53-7,60 (m, 1H, H_{атом пиразола}), 8,14 (t, 1H, H_{центральный атом}, J=9,1 Гц), 8,17 (s, 1H, H_{пиразинон}), 8,36 (d, 1H, H_{руг}, J=5,6 Гц), 8,87 (s, 1H, NH_{мочевина}), 8,98 (s, 1H, NH_{мочевина}), 12,90 (s, 1H, NH). LC-MS, t_R = 2,61 мин, m/z: 531,2 (M)⁺, расчет. для C₂₇H₂₃F₂N₇O₃. HRMS: (M)⁺ расчет. для C₂₇H₂₃F₂N₇O₃, 531,1830, обнаруженная: 531,1832.

Способ H. В 4-(3-фтор-4-аминофенил)пиридин-[2,3-b]пиразин-2-ону (169,5 г, 0,623 моль) загружали фенил N-[3-трет-бутил-1-(3-фторфенил)-1H-пиразол-5-ил]карбамат (220 г, 0,623 моль) и DMSO (1,7 л). Реакционную смесь перемешивали при 20-22°C в течение ночи. ¹H ЯМР указывал на то, что реакция завершена. Реакцию гасили водой (8,6 л) и перемешивали в течение 1 ч, затем фильтровали и промывали водой (2 x 2 л). Материал сушили при 60°C в течение выходных. Обеспечивали образование взвеси твердого вещества в EtOAc (3,39 л) в течение 1 ч, фильтровали и промывали EtOAc (750 мл) с получением 320 г титульного соединения. ЯМР указывал на то, что фенол еще присутствует. Обеспечивали повторное образование взвеси материала в EtOAc (3,2 л) в течение 1 ч, фильтровали, промывали EtOAc (500 мл) и сушили с получением 293 г титульного соединения (9% EtOAc по весу согласно ЯМР, одна примесь, 0,8 вес.%). Твердое вещество перекристаллизовывали из THF (5,7 л) и гептана (2,85 л), обеспечивая остывание партии до комнатной температуры перед фильтрацией твердых веществ. Осадок на фильтре промывали гептаном (2,85 л) и сушили при 45°C в течение ночи с получением 221 г титульного соедине-

ния. Анализ HPLC показал, что предыдущая примесь на 0,8% (по весу) снижалась до 0,23% (по весу); однако имело место обогащение примесью мочевины до 0,58% (по весу). ^1H ЯМР показал 5% гептана (по весу). Материал сушили при 110°C в течение 12 ч, чтобы довести уровень гептана до $< 0,5\%$ (по весу) согласно ЯМР, что дает в общей сложности 211 г титульного соединения в виде белого кристаллического твердого вещества с выходом 64%. Чистота по HPLC - 98,8% (по весу), одна примесь - 0,58% (по весу).

Синтез 14. 1-[3-трет-бутил-1-[(3-метилфенил)-1H-пиразол-5-ил]3-[2-фтор-4(3-оксо-3,4-дигидропиридо[2,3-b]пиразин-8-илокси)фенил]мочевина (ТВАР-002)

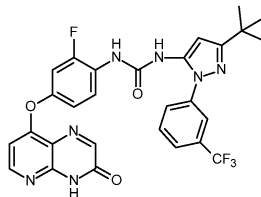


Титульное соединение в виде грязно-белого твердого вещества получали с применением способа G с использованием 3-трет-бутил-1-(3-метилфенил)-1H-пиразол-5-карбоновой кислоты (80 мг, 0,31 ммоль) и 4-(3-фтор-4-аминофенил)пиридин[2,3-b]пиразин-2-она (40 мг, 0,15 ммоль).

Выход: 69 мг (87,4%).

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ : 1,28 (s, 9H, t-Bu), 2,40 (s, 3H, 3-CH₃), 6,39 (s, 1H, H_{пиразол}), 6,64 (d, 1H, H_{руг}, J=5,6 Гц), 7,02-7,06 (m, 1H, H_{центральный атом}), 7,22-7,36 (m, 4H, 3H_{Атом пиразола} + 1H_{центральный атом}), 7,43 (t, 1H, H_{Атом пиразола}, J=7,7 Гц), 8,16 (t, 1H, H_{центральный атом}, J=9,1 Гц), 8,17 (s, 1H, H_{пиразинон}), 8,36 (d, 1H, H_{руг}, J=5,6 Гц), 8,81 (s, 1H, NH_{мочевина}), 8,98 (s, 1H, NH_{мочевина}), 12,90 (s, 1H, NH). LC-MS, t_R = 2,65 мин, m/z: 527,2 (M)⁺, расчет. для C₂₈H₂₆FN₇O₃. HRMS: (M+H)⁺ расчет. для C₂₈H₂₆FN₇O₃, 527,2081, обнаруженное: 527,2088.

Синтез 15. 1-[3-трет-бутил-1-[(3-трифторметилфенил)-1H-пиразол-5-ил]3-[2-фтор-4(3-оксо-3,4-дигидропиридо[2,3-b]пиразин-8-илокси)фенил]мочевина (ТВАР-003)

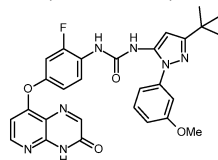


Титульное соединение в виде грязно-белого твердого вещества получали с применением способа G с использованием 3-трет-бутил-1-(3-трифторметилфенил)-1H-пиразол-5-карбоновой кислоты (97 мг, 0,31 ммоль) и 4-(3-фтор-4-аминофенил)пиридин[2,3-b]пиразин-2-она (40 мг, 0,15 ммоль).

Выход: 70 мг (80,4%).

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ : 1,30 (s, 9H, t-Bu), 6,42 (s, 1H, H_{пиразол}), 6,64 (d, 1H, H_{руг}, J=5,6 Гц), 7,02-7,06 (m, 1H, H_{центральный атом}), 7,27-7,36 (m, 1H, H_{центральный атом}), 7,74-7,80 (m, 2H, H_{Атом пиразола}), 7,86-7,90 (m, 2H, H_{Атом пиразола}), 8,05 (t, 1H, H_{центральный атом}, J=9,1 Гц), 8,17 (s, 1H, H_{пиразинон}), 8,36 (d, 1H, H_{руг}, J=5,6 Гц), 8,87 (s, 1H, NH_{мочевина}), 8,93 (s, 1H, NH_{мочевина}), 12,90 (s, 1H, NH). LC-MS, t_R = 2,71 мин, m/z: 581,2 (M)⁺, расчет. для C₂₈H₂₃F₄N₇O₃. HRMS: (M+H)⁺ расчет. для C₂₈H₂₃F₄N₇O₃, 581,1798, обнаруженное: 581,1796.

Синтез 16. 1-(3-трет-бутил-1-(3-метоксифенил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(2-фтор-4-(3-оксо-3,4-дигидропиридо[3,2-b]пиразин-8-илокси)фенил)мочевина (ТВАР-004)



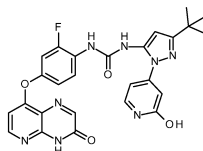
Титульное соединение в виде светло-желтого твердого вещества получали с применением способа G с использованием 3-трет-бутил-1-(3-метоксифенил)-1H-пиразол-5-карбоновой кислоты (60 мг, 0,22 ммоль) и 8-(4-амино-3-фторфенокси)пиридо[2,3-b]пиразин-3(4H)-она (31,6 мг, 0,12 ммоль).

Выход: 50 мг (84%).

^1H -ЯМР (DMSO-d_6), δ (ppm), J (Гц): 1,29 (s, 9H, трет-Bu), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 6,41 (s, 1H, PyzH), 6,66 (d, $^3J_{\text{HH}}=5,7$, 1H, PyzH), 7,01-7,12 (m, 4H, ArH), 7,31 (m, 1H, ArH), 7,46 (t, $^3J_{\text{HH}}=8,1$, 1H, ArH), 8,18 (m, 2H, ArH), 8,38 (d, $^3J_{\text{HH}}=5,7$, 1H, PyzH), 8,85 (br s, 1H, NH), 9,03 (br s, 1H, NH), 12,92 (br s, 1H, NH);

^{19}F -ЯМР (DMSO-d_6), δ (ppm): -124,8. LC-MS (2,59 мин.): m/z расчет. для C₂₈H₂₇FN₇O₄ [M+H]⁺: 544,1; обнаруженное: 544,1. HRMS (3,19 мин.): m/z расчет. для C₂₈H₂₇FN₇O₄ [M+H]⁺: 544,21031; обнаруженное: 544,21029.

Синтез 17. 1-(3-трет-Бутил-1-(2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-ил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(2-фтор-4-(3-оксо-3,4-дигидропиридо[3,2-b]пиразин-8-илокси)фенил)мочевина (ТВАР-005)



С применением способа G с использованием гидрохлорида 3-трет-бутил-1-(2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-ил)-1H-пиразол-5-карбоновой кислоты (70,8 мг, 0,238 ммоль) и 8-(4-амино-3-фторфенокси)пиридо[2,3-b]пиразин-3(4H)-она (32,4 мг, 0,119 ммоль) получали твердое вещество, которое очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя 5 → 30% (по объему) MeOH в DCM, с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества.

Выход: 15 мг (24%).

¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Гц): 1,28 (s, 9H, трет-Bu), 6,43 (s, 1H, PyzH), 6,50 (d, ³J_{HH}=2,2, 1H, ArH), 6,58 (dd, ³J_{HH}=7,2, 2,2, 1H, ArH), 6,66 (d, ³J_{HH}=5,6, 1H, PyzH), 7,06 (m, 1H, ArH), 7,32 (m, 1H, ArH), 7,50 (d, ³J_{HH}=7,2, 1H, ArH), 8,13 (m, 1H, ArH), 8,18 (m, 1H, ArH), 8,37 (d, ³J_{HH}=5,6, 1H, PyzH), 9,05 (br s, 1H, NH), 9,13 (s, 1H, NH), 11,66 (br s, 1H, NH), 12,90 (br s, 1H, NH). LC-MS (2,36 мин): m/z расчет. для C₂₆H₂₄FN₈O₄ [M+H]⁺: 531,1; обнаружено: 531,2. HRMS (2,97 мин): m/z расчет. для C₂₆H₂₄FN₈O₄ [M+H]⁺: 531,18991; обнаружено: 531,18952.

Биологические способы и данные DELFIA-анализ киназной активности

Соединения оценивали в анализе киназной активности, выполняемом согласно следующему протоколу.

Получение ^{v600E}BRAF

^{v600E}BRAF создавали путем инфицирования клеток насекомых SF9, культивируемых в среде SF-900 II (Invitrogen, Пэйсли, Шотландия), бакуловирусом, содержащим полноразмерный BRAF человека с N-концевой гистидиновой меткой, и очищали с помощью никель-агарозной аффинной хроматографии.

Получение GST-MEK

Полноразмерный белок MEK1 кролика экспрессировали с меткой GST HaN-конце и с C-концевой гистидиновой меткой в бактериях Escherichia coli JM109 и очищали с помощью никель-агарозной аффинной хроматографии.

Очистка ^{v600E}BRAF и GST-MEK

Процедура

1. Лизировать клетки в ресуспендирующем буфере (1 мл на 10 мл культуры SF9 или культуры JM109 для BRAF или MEK, соответственно), разрушать ультразвуком в течение 1-2 мин и осаждать при 14000 об./мин (в пробирках на 2 мл) в течение 10 мин.
2. Взять 1,5 мл никель-агарозных "гранул" на 10 мл лизата и добавить в колонку (Biorad).
3. Промыть колонку ресуспендирующим буфером 3 раза.
4. Добавить лизат в колонку.
5. Промыть 3 раза 10 мл буфера для промывки.
6. Добавить 10 мл элюирующего буфера к гранулам и собрать в пробирки на 2 мл.
7. Проверить концентрацию белка в смывах и диализировать в течение ночи при 4°C в буфере для диализа.

Буферы

Таблица 3

Раствор	Ресуспендирующий буфер (100 мл)	Промывочный буфер (100 мл)	Элюирующий буфер (30 мл)
1 M Tris pH 8,0	50 mM - 5 мл	50 mM - 5 мл	50 mM - 1,5 мл
5 M NaCl	100 mM - 2 мл	100 mM - 2 мл	100 mM - 600 мкл
1 M MgCl ₂	0,5 mM - 50 мкл	-	-
Triton X100	10% - 1 мл	10% - 1 мл	10% - 300 мкл
1 M бензамидин	1 mM - 100 мкл	1 mM - 100 мкл	1 mM - 30 мкл
Апротинин (5 мг/мл)	5 мкг/мл - 100 мкл	5 мкг/мл - 100 мкл	5 мкг/мл - 30 мкл
Лейпептин (5 мг/мл)	10 мкг/мл - 200 мкл	10 мкг/мл - 200 мкл	10 мкг/мл - 60 мкл
1 M PMSF	1 mM - 100 мкл	1 mM - 100 мкл	1 mM - 30 мкл
Имидазол	-	-	150 mM - 2,25 мл
β-Меркаптоэтанол	-	-	1% - 300 мкл

Буфер для диализа (перемешивать и хранить в холодном помещении)

Раствор	Объем
1 М Tris pH 7,5	20 мл
0,5 М EDTA pH 8,0	2 мл
Triton X100	1 мл
Вода	До 0,5 л
Глицерол	До 1 л
β -Меркаптоэтанол	3 мл (перед применением)

Буфер для киназы DELFIA (DKB)

Реагент	Исходная концентрация	Объем на мл (мкл)	Объем на 10 мл планшет (мкл)
20 мМ MOPS pH 7,2	0,2 М	100	1000
0,5 М EGTA pH 8,0	0,5 М	10	100
10 мМ MgCl ₂	1 М	10	100
0,1% β -меркаптоэтанол	-	1	10
25 мМ β -глицерофосфат	0,5 М	50	500
Вода	100%	829	8290

MOPS = 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота (Sigma M3183).

EGTA = этиленгликоль-бис(2-аминоэтил эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (Sigma E3889).

DKB1 (DKB с белками BRAF и MEK)

Объединить 4950 мкл DKB и 50 мкл 2,5 мг/мл исходного раствора GST-MEK, полученного, как описано выше (с получением 1 мг MEK на 40 мкл). Затем добавить 22,5 мкл исходного раствора BRAF, полученного как описано выше, с получением ~0,2 мкл BRAF на 40 мкл.

DKB2 (DKB с белком MEK)

Объединить 4950 мкл DKB и 50 мкл 2,5 мг/мл исходного раствора GST-MEK (с получением 1 мг MEK на 40 мкл). Использовать 500 мкл данной смеси для контроля гашения (BO) и пустого вектора (EV).

АТФ

Исходный раствор 100 мМ АТФ в дистиллированной воде разбавить до 500 мкМ с получением 100 мкМ конечной концентрации в анализе.

Ингибиторы (тестируемые соединения)

Исходный раствор 100 мМ разбавить до 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, 0,003, 0,001, 0,0003 и 0,0001 мМ в DMSO в планшете для лекарственных средств, получая концентрации 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, 0,003 и 0,001 мкМ в анализе.

Первичное антитело

Фосфо-MEK1/2 CST #9121S, разбавленное 1:1000 в аналитическом буфере (AB) для DELFIA. Предварительно инкубировать антитело в AB в течение 30 мин при комнатной температуре перед применением.

Вторичное антитело

Меченое европием вторичное антитело против кроличьего, Perkin Elmer #AD0105, разбавленное 1:1000 в аналитическом буфере (AB) для DELFIA. Предварительно инкубировать антитело в AB в течение 30 мин при комнатной температуре перед применением. (Первичное и вторичное антитела инкубировали совместно.)

Раствор Tween 0,1% Tween 20 в воде.

Аналитический буфер

Аналитический буфер для DELFIA Perkin Elmer #4002-0010.

Усиливающий раствор

Усиливающий раствор для DELFIA Perkin Elmer #4001-0010.

Аналитические планшеты

96-луночный покрытый глутатионом черный планшет Perbio #15340.

Процедура

1. Предварительно заблокировать лунки 5% раствором молока в TBS в течение 1 ч.
2. Промыть лунки 3 раза 200 мкл TBS.
3. Осадить 40 мкл DKB1 для всех ингибиторов (тестируемых соединений), контроля с DMSO и обязательно других контрольных соединений.
4. Осадить 40 мкл DKB2 в лунки для BO и EV.
5. Добавить ингибиторы (тестируемые соединения) при 0,5 мкл на лунку в соответствии с желаемой

планировкой планшетов.

6. Добавить 0,5 мкл DMSO в лунки для контроля носителем.
7. Добавить 2 мкл BRAF в лунки для VO и EV.
8. Предварительно инкубировать с тестируемыми соединениями в течение 10 мин при комнатной температуре со встряхиванием.
9. Добавить 10 мкл из 500 мкМ исходного раствора ATP в DKB с получением аналитической концентрации 100 мкМ.
10. Герметизировать планшеты с помощью TopSeal и инкубировать при комнатной температуре со встряхиванием в течение 45 мин.
11. Промыть планшеты 3 раза 200 мкл смеси 0,1% Tween20/вода для прекращения реакции.
12. Добавить 50 мкл на лунку смеси антител и инкубировать в течение 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием.
13. Промыть планшеты 3 раза с 200 мкл смеси 0,1% Tween20/вода.
14. Добавить 100 мкл усиливающего раствора DELFIA на лунку, накрыть фольгой и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 мин со встряхиванием.
15. Считывать на планшет-ридере Victor (Perkin-Elmer, Турку, Финляндия) с использованием протокола для европия.

Значения для холостой пробы (пустой вектор) вычитают из всех значений. Контроли с DMSO устанавливают как 100% активность и точки анализа (ответы) рассчитывают как процентную долю контроля с DMSO. Данные наносят на график с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и линию для нелинейной регрессии рассчитывают с помощью сигмоидального уравнения "доза-ответ" с изменяемым наклоном:

$$Y = \text{нижнее значение} + [\text{верхнее значение} - \text{нижнее значение}] / [1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{наклон})}],$$

где X представляет собой логарифм концентрации и Y представляет собой ответ. Значение IC₅₀, генерируемое с использованием этой процедуры, представляет собой концентрацию лекарственного средства, которая производит процентную долю контрольной флуоресценции посередине между насыщением и плато нулевого эффекта. Как правило, выполняются три независимых анализа и сообщается среднее значение IC₅₀.

Данные обобщены в следующей таблице.

Соединение	IC ₅₀ (мкМ)
ТВАР-01	0,062
ТВАР-02	0,099
ТВАР-03	0,13
ТВАР-04	0,047
ТВАР-05	0,39

Клеточный анализ активности фосфо-ERK (мутантные по BRAF клетки WM266.4)

Соединения оценивали с использованием клеточного анализа, который выполняли согласно следующему протоколу.

День 0.

Осадить 16000 мутантных по BRAF WM266.4 клеток/лунку в 99 мкл среды в 96-луночном планшете.

День 1.

1. Добавить 1 мкл тестируемого соединения к клеткам (в общей сложности 1 мкл раствора).
2. Инкубировать клетки с тестируемым соединением в течение 6 ч при 37°C.
3. Удалить раствор из всех лунок.
4. Зафиксировать клетки 100 мкл 4% формальдегида/0,25% Triton X-100 в PBS на лунку.
5. Инкубировать планшет в течение 1 ч при 4°C.
6. Удалить фиксирующий раствор и добавить 300 мкл TBS на лунку.
7. Оставить планшет в течение ночи при 4°C.

День 2.

1. Промыть планшет 2 раза 200 мкл PBS на лунку.
2. Блокировать 100 мкл раствора 5% сухого молока в TBS.
3. Инкубировать планшет в течение 20 мин при 37°C.
4. Промыть планшет 2 раза 0,1% tween/H₂O.
5. Добавить 50 мкл раствора 3 мкг/мл первичного антитела pERK (Sigma M8159), разбавленного в 5% молочном порошке/TBS, в каждую лунку.
6. Инкубировать планшет в течение 2 ч при 37°C.
7. Промыть планшет 3 раза 0,1% tween/H₂O.
8. Добавить в каждую лунку 50 мкл 0,45 мкг/мл вторичного меченого европием антитела к мышечному антителу (Perkin Elmer).

9. Инкубировать планшеты в течение 1 ч при 37°C.
 10. Промыть планшеты 3 раза смесью 0,1% tween/H₂O.
 11. Добавить 100 мкл усиливающего раствора (Perkin Elmer) в каждую лунку.
 12. Оставить планшеты в течение примерно 10 мин при комнатной температуре перед осторожным встряхиванием планшета.
 13. Считать флуоресценцию европия с временным разрешением на планшет-ридер Victor2 (Perkin-Elmer, Турку, Финляндия).
 14. Промыть планшеты 2 раза 0,1% tween/H₂O.
 15. Измерить концентрацию белка с использованием анализа с бидинхониновой кислотой (BCA, Sigma) путем добавления по 200 мкл раствора на лунку.
 16. Инкубировать планшеты в течение 30 мин при 37°C.
 17. Считывать уровни оптической плотности при длине волны 570 нм в планшет-ридер.
- Обратите внимание, что число импульсов европия нормализуют по уровням белка путем деления числа импульсов на оптическую плотность.

Значения для холстой пробы (без клеток) вычитают из всех значений. Контроли с DMSO устанавливают как 100% активность и точки анализа (ответы) рассчитывают как процентную долю контроля с DMSO. Данные наносят на график с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и линию для нелинейной регрессии рассчитывают с помощью сигмоидального уравнения "доза-ответ" с изменяемым наклоном:

$$Y = \text{нижнее значение} + [\text{верхнее значение} - \text{нижнее значение}] / [1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{наклон})}],$$

где X представляет собой логарифм концентрации и Y представляет собой ответ. Значение IC₅₀, генерируемое с использованием этой процедуры, представляет собой концентрацию лекарственного средства, которая производит процентную долю контрольной флуоресценции посередине между насыщением и плато нулевого эффекта. Как правило, выполняются три независимых анализа и сообщается среднее значение IC₅₀.

Данные обобщены в следующей таблице.

Соединение	IC ₅₀ (мкМ)
ТВАР-01	0,018
ТВАР-02	0,012
ТВАР-03	0,019
ТВАР-04	0,008
ТВАР-05	0,45

Анализ пролиферации клеток с SRB (SRB GI₅₀)

Клеточные линии культивируют обычным образом в DMEM или RPMI1640, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой при 37°C в 10% CO₂ и насыщенной водой атмосфере. Культуры поддерживают в экспоненциальной фазе роста посредством субкультивирования до начала слияния (интервалы 3-5 дней). Суспензии из отдельных клеток получают при сборе из колбы для культивирования тканей на 80 см² с 5 мл коммерческого трипсина в EDTA. Через 5 мин отделенные клетки смешивают с 5 мл полной дополненной культуральной среды и центробежно осаждают (1000 об./мин в течение 7 мин). После удаления надосадочной жидкости клеточный осадок ресуспендируют в 10 мл свежей среды и клетки полностью развешивают путем протягивания полного объема вверх/вниз 5 раз через иглу 19-го калибра. Концентрацию клеток определяют с помощью гемоцитометра (в разведении 1/10). Подходящий объем для получения по меньшей мере 2-кратного избытка числа проводимых испытаний, как правило, 100-200 мл, получают путем разбавления суспензии клеток до 10000-40000/мл и 100 мкл/лунку переносят в 96-луночный планшет с использованием программируемого 8-канального пульсирующего насоса, дающего 1000-4000 клеток/лунку, оставляя колонку 12 пустой. Пластины возвращают в инкубатор на 24 ч, позволяя клеткам повторно прикрепиться.

Тестируемые соединения готовят в концентрации 10 мМ в DMSO. Аликвоты (24 мкл) разводят в 1,2 мл культуральной среды, получая 200 мкМ, и 10 серийных 3-кратных разведений выполняют путем переноса 80 мкл к 160 мкл. Аликвоты (100 мкл) каждого разведения добавляют в лунки с помощью 8-канальной пипетки, выполняя таким образом окончательное дополнительное 2-кратное разведение и получая дозы в диапазоне от 100 до 0,005 мкМ. Колонка 11 вмещает только чистую питательную среду. Каждое соединение тестируют в четырех повторах, каждый повтор представляет собой среднее для четырех лунок.

После дополнительного роста в течение 5 дней планшеты опорожняют и клетки фиксируют в 10% трихлоруксусной кислоте в течение 30 мин при температуре 4°C. После тщательной промывки в проточной водопроводной воде планшеты сушат и окрашивают путем добавления 50 мкл раствора 0,1% сульфородамина-В в 1% уксусной кислоте на 10 мин при комнатной температуре. Краситель выливают и планшеты тщательно промывают под струей 1% уксусной кислоты (удаляя таким образом несвязанный краситель) и сушат. Связанный краситель забирают в раствор путем добавления 100 мкл Tris-буфера, pH

8 с последующими 10 мин на встряхивателе для планшетов (примерно 500 об./мин). Оптическую плотность при длине волны 540 нм в каждой лунке (пропорциональна количеству присутствующих клеток) определяют с использованием планшет-ридера.

После усреднения значений холостой пробы в колонке 12 его вычитали из всех значений и результаты выражали в виде процентной доли значения без обработки (колонка 11). Полученные таким образом 10 значений (в четырех повторах) наносили на график в зависимости от логарифма концентрации лекарственного средства и анализировали методом нелинейной регрессии с четырьмя параметрами логистического уравнения, устанавливая ограничения, если предложено при рассмотрении. Значение GI_{50} , генерируемое с использованием этой процедуры, представляет собой концентрацию лекарственного средства, которая производит процентную долю контрольной A_{540} посередине между насыщением и плато нулевого эффекта.

Результаты для диапазона клеточных линий обобщены ниже.

Таблица 8	
Данные анализа пролиферации клеток с SRB для TBAP-01 в панели клеточных линий, мутантных по BRAF (mutBRAF)	
Клеточная линия	GI_{50} (мкМ)
A375 (меланома)	0,178
WM266.4 (меланома)	0,062
UACC62 (меланома)	0,072
LOX INVI (меланома)	0,093
HT29 (рак ободочной и прямой кишки)	0,59
COLO205 (рак ободочной и прямой кишки)	0,043
RKO (рак ободочной и прямой кишки)	0,69
Mawi (рак ободочной и прямой кишки)	0,49
WiDr (рак ободочной и прямой кишки)	0,39
Colo741 (рак ободочной и прямой кишки)	0,48

Таблица 9	
Данные анализа пролиферации клеток с SRB для TBAP-01 в панели клеточных линий, мутантных по RAS	
Клеточная линия	GI_{50} (мкМ)
SW620 (рак ободочной и прямой кишки человека)	0,48
HCT116 (рак ободочной и прямой кишки человека)	0,60
SKMEL2 (меланома человека)	0,39
DO4 (меланома человека)	0,71
WM1361 (меланома человека)	0,39
PDAC R172H (p53 mut) (рак поджелудочной железы мыши)	1,15
MiaPaCa (рак поджелудочной железы человека)	0,29
Panc-1 (рак поджелудочной железы человека)	2,78
RPMI8226 (миелома человека)	0,49
A549 (рак легких человека)	1,81
H23 (рак легких человека)	1,26

Таблица 10	
Данные анализа пролиферации клеток с SRB для TBAP-01 в панели клеточных линий с BRAF и RAS дикого типа (wtBRAF/RAS)	
Клеточная линия	GI_{50} (мкМ)
D35 (меланома человека)	1,45
KM12 (рак ободочной и прямой кишки человека)	1,74
D24 (меланома человека)	2,73

Таблица 11 Данные анализа пролиферации клеток с SRB для ТВAP-01 на дополнительных клеточных линиях	
Клеточная линия	GI ₅₀ (мкМ)
A375	0,178
A375/R (сделана устойчивой к PLX4720 <i>in vitro</i>)	0,839
A375/R/X (сделана устойчивой к PLX4720 <i>in vivo</i>)	0,252
A375/DR (сделана устойчивой к PLX4720 и дабрафенибу <i>in vivo</i>)	0,95
Colo829	0,189
Colo829/R (сделана устойчивой к PLX4720 <i>in vitro</i>)	0,029
DO4 (мутантная по NRAS)	0,275
SBCL2 (мутантная по NRAS)	0,719
Наивная клеточная линия RM-11, полученная от пациента, не получавшего лечение, с индуцированной <i>in vitro</i> устойчивостью к PLX4720	1,34
Клетки меланомы LP2 CL2 (LINE 1), полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, приобрели устойчивость к вемурафенибу)	0,043
Клетки меланомы LP2 CL3, полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, приобрели устойчивость к вемурафенибу)	0,269
Клетки меланомы RM-7, полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, приобрели устойчивость к вемурафенибу)	2,6
Клетки меланомы RM-2 (LINE 2), полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, естественная устойчивость к вемурафенибу)	0,569
Клетки меланомы RM-17 (LINE 3), полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, устойчивые к комбинации дабрафениба и траметиниба)	2,600
Клетки меланомы RM33S, полученные от пациента-человека (wt BRAF, wt RAS, устойчивые к ипидимумабу)	1,13

Исследования на ксенотрансплантатах

Для стандартных клеточных линий клетки инокулировали подкожно в виде суспензии (0,2 мл) в бок бестимусных или с тяжелым комбинированным иммунодефицитом самок мышей. Группам из 7-8 мышей назначали лечение после стратифицированного распределения объемов опухоли. Обработку с ТВAP-01 начинали в дни 11-14 после введения клеток. Через желудочный зонд вводили 200 мкл суспензии (DMSO:вода, 1:19, об./об. при 10 мг/кг). Контрольные животные получали аналогичные дозы носителя (DMSO:вода, 1:19, об./об.). Обработку с ТВAP-01 проводили один раз в день в течение 24 доз.

Для ксенотрансплантатов, полученных от пациента (PDX), свежую ткань собирали непосредственно после операции в RPMI, дополненную 10% FBS. Ткань переносили в стерильную чашку Петри. Некротические части опухоли удаляли и образец 5x5x5 мм имплантировали подкожно в бок мыши NOD Cb 17 SCID. Когда опухоль достигала предельных размеров, официально разрешенных Министерством внутренних дел, ее вырезали и жизнеспособную ткань разрезали на кубики 5x5x5 мм и трансплантировали в дополнительных мышей NOD Cb 17 SCID с использованием той же процедуры. Геномный и гистологический анализы подтвердили, что опухоли в каждой точке получали из исходного материала. После трансплантации опухоли RM-2 (LINE 2) (мутантный по BRAF ксенотрансплантат, полученный от пациента с естественной устойчивостью к вемурафенибу), опухолям RM-17 (LINE 3) (мутантный по BRAF ксенотрансплантат, полученный от пациента, устойчивый к комбинации дабрафениб+траметиниб) и RM33S (с BRAF дикого типа и Ras дикого типа от пациента, который устойчив к ипидимумабу) позволяли расти до примерно 50-60 мм³ до начала лечения путем ежедневного орогастрального введения через желудочный зонд ТВAP-01 при 20 мг/кг/день или носителя в течение 24 или 17 дней соответственно. Полученную от пациента клеточную линию LP2-CL2 (LINE 1) (мутантная по BRAF, получена от пациента, который приобрел устойчивость к вемурафенибу в клинике через 3 месяца лечения) создавали из свежей ткани, собранной после операции. Клетки выращивали в RPMI, дополненной 10% FBS.

Результаты обобщены в следующей таблице.

Таблица 12		
Исследования на ксенотрансплантатах		
Терапевтическая эффективность:		
отношение объем опухоли (обработанная)/объем опухоли (контроль)		
Ксенотрансплантат	ТВАР-01	ТВАР-02
Клетки меланомы человека A375 (мутантные по BRAF)	0,07	0,31
Клетки меланомы человека WM266.4 (мутантные по BRAF)	0,08	-
Клетки меланомы человека A375/R (мутантные по BRAF, устойчивые к вемурафенибу)	0,33	-
Клетки рака ободочной и прямой кишки человека SW620 (мутантные по RAS)	0,4	-
PDAC R172H (p53 mut) (рак поджелудочной железы мыши)	0,45	
Клетки меланомы LP2 CL2 (LINE 1), полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, приобрели устойчивость к вемурафенибу)	0,09	-
Клетки меланомы RM-2 (LINE 2), полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, естественная устойчивость к вемурафенибу)	0,13	-
Клетки меланомы RM-17 (LINE 3), полученные от пациента-человека (мутантные по BRAF, устойчивые к комбинации дабрафениба и траметиниба)	0,18	-
Клетки меланомы RM33S, полученные от пациента-человека (wt BRAF, wt RAS, устойчивые к ипилимумабу)	0,45	

Исследования биомаркеров

Клетки инокулировали подкожно в виде суспензии (0,2 мл) в бок бестимусных мышей-самок. Группам из 3-6 мышей назначали лечение однократной дозой тестируемого соединения (для исследований иммуноблоттинга, приведенных в табл. 13) или 4 ежедневными дозами (для иммуногистохимических исследований, приведенных в табл. 13) через 14-21 день после введения клеток. Через желудочный зонд вводили 200 мкл суспензии 40-50 мг/кг ТВАР-01 в DMSO:вода. Контрольные животные получали аналогичные дозы носителя (DMSO:вода, 1:19, об./об.). Опухоли собирали через 2-8 ч после введения дозы и лизировали в 1% лизирующем буфере NP40 (100 мкл буфера/15 мг ткани) с использованием гомогенизатора для тканей (Precellys 24). Содержание общего белка измеряли с помощью анализа на белок при 660 нм (Pierce) и 40 мкг общего белка загружали в SDS-page для дальнейшего иммуноблоттинга.

Антитела к ERK2 (Santa Cruz Technologies), фосфо-MEK (Cell Signaling) и фосфо-ERK (Sigma) использовали для иммуноблоттинга; сигнал обнаруживали с помощью вторичных флуоресцентных антител (Invitrogen и Li-cor) на системе Odyssey (Li-cor). В качестве альтернативы, опухоли собирали через 1 час после заключительного введения дозы в конце терапии (24 ежедневные дозы) и обрабатывали таким же образом, как описано выше.

Иммуногистохимия (ИHC). Опухоли фиксировали в формалине и подготавливали, как описано в другом месте (см., например, Dhomen et al., 2009) для окрашивания гематоксилином и эозином, кроличьим pSRC (Invitrogen 44660G) и pERK (Cell Signaling 20G11). Положительные и отрицательные контроли включали в каждый эксперимент. Подсчет характера и интенсивности окрашивания проводили слепым методом.

Данные обобщены в следующей таблице, где показана процентная доля снижения фосфо-MEK (ppMEK) и фосфо-ERK (ppERK) по сравнению с обработанными носителем контролями для ТВАР-01. pMEK и pERK нормализованы по общему ERK в обработанных образцах, а также в контрольных образцах.

Биомаркер	Клетки меланомы человека WM266.4 (мутантные по BRAF) (1 доза)	Клетки рака ободочной и прямой кишки человека SW620 (мутантные по RAS) (1 доза)	Клетки рака поджелудочной железы мыши PDAC R172H (мутантные по RAS) (4 ежедневные дозы)	Клетки рака поджелудочной железы мыши PDAC R172H (мутантные по RAS) (24 ежедневные дозы)
ppMEK 2 ч	60%			
ppMEK 4 ч		42%		
ppMEK 8 ч	68%			
ppERK 1 ч				85%
ppERK 2 ч	67%			
ppERK 8 ч	40%			
pSRC 4 ч			80%	

Исследования фармакокинетики

Самок мышей BALB/cAnNCrI возрастом по меньшей мере 6 недель использовали для анализов РК. Мышам дозу вводили внутривенно (2 мг/кг, в смеси DMSO:Tween 20:вода 10:1:89 об./об.) или перорально с помощью желудочного зонда. Образцы брали в 7 или 8 временных точках от 5 мин до 18 или 24 ч при внутривенном пути и в 6 или 8 временных точках от 15 мин до 18 или 24 ч при пероральном пути. По три мыши использовали на временную точку на путь введения. Их помещали под галотановую или изофлурановую анестезию и брали кровь для получения плазмы путем терминальной сердечной пункции в гепаринизированные шприцы. Образцы плазмы быстро замораживали в жидком азоте и затем хранили при -70°C до проведения анализа. Все процедуры с участием животных проводились в соответствии с национальными правилами Министерства внутренних дел согласно Закону о животных (научные процедуры) 1986 г. и в рамках руководящих принципов, изложенных Комитетом института по контролю этических норм обращения с животными и Специальным комитетом по обеспечению благосостояния животных при экспериментальном новообразовании Координационного комитета Соединенного Королевства по исследованиям рака.

Данные обобщены в следующей таблице.

Соединение	C_{max} (нМ) (10 мг/кг перорально)	AUC (ч*нмоль/л) (10 мг/кг перорально)	Время, в течение которого концентрация лекарственного средства становится выше SRB GI ₅₀ (часы)
ТВАР-01	68,831	509,747	>18
ТВАР-02	13,041	41,754	>18
ТВАР-03	25,533	48,158	>18
ТВАР-04	47,870	125,950	>6

Ингибирование hERG

Исследования проводили в Cyprotex Discovery в графстве Чешир, Соединенное Королевство, в соответствии с протоколом разработчика. Исследования проводили на приборе IonWorks™ HT (Molecular Devices Corporation), который автоматически выполняет электрофизиологические измерения в 48 одиночных клетках одновременно в специализированном 384-луночном планшете (PatchPlate™). Использовали клетки яичника китайского хомячка (CHO), стабильно трансфицированные hERG (клеточная линия получена от Cytomux, Соединенное Королевство). Суспензию одиночных клеток получали во внеклеточном растворе (фосфатно-солевой буферный раствор Dulbecco с кальцием и магнием, pH 7-7,2) и аликвоты добавляли автоматически в каждую лунку PatchPlate™. Затем клетки располагали над небольшим отверстием в нижней части каждой лунки с применением вакуума под планшетом для формирования электрического уплотнения. Вакуум применяли через один компартмент, общий для всех лунок, который наполняли внутриклеточным раствором (забуференный до pH 7,2 с помощью HEPES). Сопротивление каждого уплотнения измеряли с помощью общего заземляющего электрода во внутриклеточном компартменте и отдельных электродов, расположенных в каждой из верхних лунок.

Затем обеспечивали электрический доступ к клетке с помощью циркулирования перфорирующего средства амфотерицина под PatchPlate™ и последующего измерения тока hERG до введения соединения. Электрод располагали во внеклеточном компартменте и применяли исходный потенциал -80 мВ в течение

ние 15 с. Затем активировали каналы hERG при применении этапа деполяризации до +40 мВ в течение 5 с и затем фиксировали при -50 мВ в течение 4 с, чтобы вызвать следовой ток hERG, прежде чем вернуться к -80 мВ в течение 0,3 с. Затем автоматически добавляли тестируемое соединение в верхние лунки PatchPlate™ из 96-луночного микротитровального планшета, содержащего диапазон концентраций соединения ТВАР-01. Хинидин, установленный ингибитор hERG, включали в качестве экспериментального контроля. ТВАР-01 растворяли в DMSO и анализировали в конечных концентрациях в диапазоне от 100 мкМ до 32 нМ в 0,25% DMSO. Буфер, содержащий 0,25% DMSO, включали в качестве отрицательного контроля. Тестируемое соединение оставляли в контакте с клетками в течение 300 с перед регистрацией токов с использованием такого же протокола этапов напряжения, как и при сканировании до введения соединения. Каждую концентрацию тестировали в 4 дублирующихся лунках.

Значения тока после введения соединения выражали в виде процентной доли значений тока до введения соединения и строили на графике в зависимости от концентрации для каждого соединения. Там, где наблюдалось зависимое от концентрации ингибирование, данные устанавливали по следующему уравнению:

$$y = (y_{\max} - y_{\min}) / (1 + (x/x_{50})^s) + y_{\min}$$

где

y = (ток после введения соединения/ток до введения соединения) \times 100;

x = концентрация;

x_{50} = концентрация, необходимая для ингибирования тока на 50% (IC_{50}); и

s = наклон графика.

Данные обобщены в следующей таблице.

Соединение	IC_{50} (мкМ)
ТВАР-01	>100
ТВАР-02	65
ТВАР-03	>100
ТВАР-04	>100
ТВАР-05	-

Активность по отношению к другим мишеням

Исследования проводили в Life Technologies в Пэйсли в соответствии с протоколом разработчика. ТВАР-01 растворяли в DMSO и анализировали в конечных концентрациях в диапазоне от 10 мкМ до 0,5 нМ в 1% DMSO в присутствии АТФ в концентрации 100 мкМ. Значения IC_{50} для тестируемых соединений определяли с помощью биохимического анализа Z'-LYTE®, использующего флуоресцентный формат с захваченным ферментом, основанный на различной чувствительности фосфорилированных и нефосфорилированных пептидов к протеолитическому расщеплению.

Дополнительные исследования проводили в Международном центре профилирования киназ (The International Centre for Kinase Profiling) в Данди в соответствии с протоколом разработчика. ТВАР-01 растворяли в DMSO и анализировали в конечной концентрации 1 мкМ в 2% DMSO относительно 131 киназы. Анализы проводили с использованием радиоактивного (^{33}P -АТФ) анализа связывания на фильтрах.

Данные обобщены в следующих таблицах.

IC_{50} для CRAF	0,033 мкМ
IC_{50} для KDR	0,12 мкМ
IC_{50} для PDGFR α	0,8 мкМ
IC_{50} для PDGFR β	0,74 мкМ
IC_{50} для MET	1,4 мкМ
IC_{50} для EGFR	1,9 мкМ
IGF1R β	78% при 1 мкМ

IC ₅₀ для Src	0,027 мкМ
IC ₅₀ для Lck	0,019 мкМ
IC ₅₀ для p38 γ	0,22 мкМ
IC ₅₀ для p38 α	0,47 мкМ
IC ₅₀ для FGFR1	0,47 мкМ
MINK1	4% активности остается при 1 мкМ
TESK1	5% активности остается при 1 мкМ
TAK1	6% активности остается при 1 мкМ
YES1	6% активности остается при 1 мкМ
ABL	4% активности остается при 1 мкМ
Tie-2	3% активности остается при 1 мкМ
TrkA	6% активности остается при 1 мкМ
DDR2	3% активности остается при 1 мкМ
VEGFR	6% активности остается при 1 мкМ

Следует отметить, например, что хорошо известно, что TAK1 является мишенью при таких формах рака, таких как лимфома и рак ободочной и прямой кишки и поджелудочной железы; TrkA является мишенью при раке легких и молочной железы; DDR2 является мишенью при таких формах рака, как плоскоклеточный рак легких; VEGFR и Tie-2 являются антиангиогенными мишенями; ABL является мишенью при лейкозе и YES1 является мишенью при таких формах рака, как меланома и рак молочной железы.

Противовирусная активность

Противовирусную активность соединений против инфекции вируса энцефаломиокарда (ECMV) ATCC® VR-129B в клетках HepG2; инфекции вируса простого герпеса HSV-1 SC16 в клетках Vero и вируса гриппа А, A/Panama/2007/99 (H3N2), в клетках MDCK анализировали в KWSBiotest (Бристоль, Соединенное Королевство) в соответствии с протоколом разработчика.

Клетки, разрешающие репликацию вируса, выращивали в достаточном количестве в питательной среде с добавками. После слияния клетки высевали на 96-луночные плоскодонные планшеты. Для определения EC₅₀ (эффективная концентрация, 50%) среду удаляли и соединения добавляли в 10-кратной конечной концентрации в 0,4% DMSO за 10 мин до инфицирования вирусом. Через 1 ч после инфицирования покрывающую среду добавляли в лунки с получением 1-кратной концентрации соединений для продолжения исследования. Лунки с контролем носителем и положительным контролем устанавливали для контроля любого влияния на жизнеспособность клеток. Для определения CC₅₀ (цитотоксическая концентрация, 50%) следовали тому же самому процессу, за исключением того, что добавляли только среду вместо инокулята вируса.

Затем индивидуальные лунки оценивали с помощью анализа МТТ, который представляет собой количественный колориметрический анализ выживания клеток млекопитающих. Клетки инкубировали в течение 3 ч с раствором 1 мг/мл МТТ. Затем интенсивность окрашивания определяли путем количественной оценки оптической плотности при соответствующей длине волны. Результат обеспечивает показание противовирусной эффективности каждого соединения в виде EC₅₀, а также CC₅₀ для демонстрации любого цитотоксического эффекта соединений на клетки в отсутствие вирусной инфекции. Инфицированные вирусом лунки также визуально проверяли на любой СРЕ или образование синцития.

Эффективная концентрация (EC₅₀)

Способность соединений снижать индуцированную вирусами гибель клеток оценивали с использованием колориметрического анализа МТТ выживания клеток млекопитающих. Результат анализа количественно оценивали с использованием планшет-ридера для ELISA и определяли EC₅₀ для каждого из соединений, анализируемых с каждым из вирусов. Результаты представляли графически вместе со стандартной ошибкой среднего (SEM) для каждой группы. Рассчитывали статистическую значимость эффективности каждого соединения.

Цитотоксическая концентрация (CC₅₀)

Цитотоксический эффект соединений оценивали с использованием колориметрического анализа МТТ выживания клеток млекопитающих. Результат анализа количественно оценивали с использованием планшет-ридера для ELISA и определяли CC₅₀ для каждого из анализируемых соединений. Результаты представляли графически вместе со стандартной ошибкой среднего (SEM) для каждой группы. Рассчитывали статистическую значимость эффективности каждого соединения.

LPS-стимулированное высвобождение TNF- α из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC)

Фактор некроза опухоли- α (TNF- α), секретируемый цитокин 17 кДа, играет важную роль в воспалительных заболеваниях и иммунных нарушениях. TNF- α в основном секретируется активированными макрофагами (см., например, Shakhov et al., 1990) и моноцитами (см., например, Yao et al., 1997) в ответ на некоторые воспалительные и иммунологические стимулы. Например, во время бактериальной инфекции липополисахарид (LPS), компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, индуцирует высвобождение TNF- α (см., например, Martich et al., 1991).

Избыточная продукция таких воспалительных цитокинов, как TNF- α , была связана с такими воспалительными нарушениями, как болезнь Крона (CD) и воспалительное заболевание кишечника (см., например, Кат et al., 2000; Nakamura et al., 2006), ревматоидный артрит (см., например, Keffer et al., 1991; McCann et al., 2010), септический шок (см., например, Link et al., 2008; Shapira et al., 1996), астма (см., например, Bergu et al., 2007), хронический бронхит (CB), хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), острое повреждение легких (ALI) и острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) (см., например, Mukhopadhyay et al., 2006). Снижение уровней TNF- α было ассоциировано с улучшением при данных состояниях.

Активность соединения ТВАР-01 при LPS-стимулированном высвобождении TNF α из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) определяли в Argenta/Charles River, Коули, Оксфорд, в соответствии с протоколом разработчика. PBMC выделяли из крови здоровых людей-добровольцев с использованием стандартной методики центрифугирования в градиенте плотности. PBMC суспендировали в среде, переносили в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C в течение 3 ч в увлажненном инкубаторе. После инкубирования среду заменяли и тестируемое соединение, эталонное соединение (BIRB796) или соответствующий носитель добавляли к клеткам и планшет и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем после инкубирования LPS (E coli 0111:84, 10 нг/мл) или соответствующий контроль носителем добавляли к клеткам и планшет возвращали в инкубатор для инкубирования в течение ночи. После инкубирования планшет центрифугировали при 300 g в течение 4 мин при комнатной температуре. Свободные от клеток надосадочные жидкости удаляли и хранили (замороженными) до анализа относительно уровней TNF- α с использованием доступного для приобретения набора для EUSA (R&D Systems).

Тестируемое соединение растворяли в DMSO и аликвоты хранили замороженными. Для каждого эксперимента использовали отдельную аликвоту. Для каждого эксперимента тестируемое соединение разводили в DMSO (до 1000 раз в конечной аналитической концентрации) и затем разводили в среде для культивирования клеток с получением требуемых концентраций при сохранении постоянной концентрации DMSO (конечная концентрация 0,1% DMSO в анализе).

Кривую доза-ответ по 8 точкам проводили с тремя отдельными экспериментами (n=3). Эффект тестируемого соединения в каждом эксперименте выражали в виде процентной доли ингибирования LPS-стимулированного ответа. Данные по процентной доле ингибирования для каждого тестируемого соединения в каждом эксперименте объединяли для определения одного значения IC₅₀ для каждого тестируемого соединения.

Обнаружили, что соединение ТВАР-01 демонстрирует сильное ингибирование с использованием данного анализа с IC₅₀ 3,4 нМ и 95% доверительным интервалом 2,0-5,7 нМ.

Сравнительные данные - 1

Данные для ТВАР-01 и известных структурно родственных соединений (AA-04 в Springer et al., 2011; и AA-018, AA-019, AA-062, AA-084 в Springer et al., 2009) обобщены ниже.

Таблица 18					
Данные по эффективности <i>in Vivo</i>					
(MED = максимальная эффективная доза)					
Соединение	Клеточная линия	Отношение опухоль/контроль			
		перорально		внутрибрюшинно	
		1 x MED	0,5 x MED	1 x MED	0,5 x MED
ТВАР-01	mutBRAF A375M	0,07	0,47	-	-
ТВАР-01	mutBRAF WM266.4	0,08	0,21	-	-
ТВАР-01	mutRAS SW620	0,40			
ТВАР-01	RM-17 (LINE 3)	0,18			
ТВАР-01	RM-2 (LINE 2)	0,13			
ТВАР-01	A375R	0,33			
ТВАР-01	PDAC R172H	0,45			
AA-018	mutBRAF A375M	-	-	0,52	-
AA-019	mutBRAF A375M	0,15	-	-	-
AA-019	mutBRAF WM266.4	0,14	0,41	-	0,34
AA-019	mutRAS SW620	0,52			
AA-019	RM-17 (LINE 3)	0,43			
AA-019	RM-2 (LINE 2)	0,19			
AA-019	A375R	0,40			
AA-019	PDAC R172H	0,56			
AA-062	mutBRAF A375M	0,66		-	-

Таблица 19			
Сравнение эффективности на клеточных линиях			
Класс	Клеточная линия	ТВАР-01 GI ₅₀ (мкМ)	AA-019 GI ₅₀ (мкМ)
мутантная по BRAF	A375	0,178	0,249
	A375/R	0,839	1,897
	A375(X)	0,163	0,372
	A375(X)/R	0,252	0,501
мутантная по NRAS	DO4	0,275	0,573
	SBCL2	0,719	1,159
Устойчива к утвержденным ингибиторам BRAF	LP2-CL2 (LINE 1)	0,043	0,684
	RM-2 (LINE 2)	0,569	1,39
	RM-17 (LINE 3)	2,6	3,0

Таблица 20				
Сравнение данных анализа				
Соединение	BRAF V600E Анализ киназной активности IC ₅₀ (мкМ)	Клеточный анализ P-ERK IC ₅₀ (мкМ)	Анализ с SRB IC ₅₀ (мкМ)	Нерг- ингибирование IC ₅₀ (мкМ)
ТВАР-01	0,062	0,018	0,062	>100
AA-04	0,650	0,137	0,291	-
AA-018	0,064	0,024	0,015	>100
AA-019	0,055	0,028	0,008	>100
AA-062	0,079	0,063	0,037	>100
AA-084	0,71	0,15	0,30	53

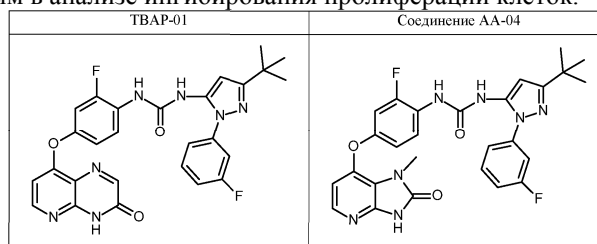
Соединение	Термодинамическая растворимость при pH 7,4 (мг/мл)	C _{max} (нМ) (10 мг/кг перорально)	AUC (ч*нмоль/л) (10 мг/кг перорально)	F% мышь	MTD у мышей (мг/кг) (ежедневно x 28 дней)
ТВАР-01	0,066	68831	509747	42	40-50 перорально
AA-018	-	33640	461407	24	10 внутривенно
AA-019	0.035	40503	416286	54	20 перорально
AA-062		1055590	5888243	100	50 перорально

Соединение	Клеточная линия	pERK (остаточный % по сравнению с контролем носителем; 24 ежедневные дозы; через 1 ч после дозы)	pSRC (остаточный % по сравнению с контролем носителем; 4 ежедневные дозы; через 4 ч после дозы)
ТВАР-01	PDAC R172H	15	20
AA-019	PDAC R172H	>100 (нет снижения)	53

Сравнительные данные - 2

По сравнению с соединением AA-04 в Springer et al., 2011, ТВАР-01 является:

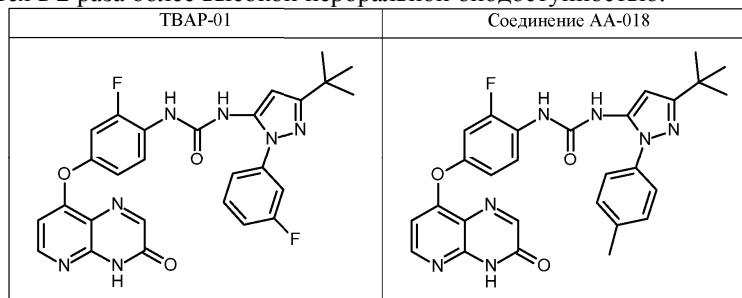
- (a) в 10 раз более сильным в анализе киназной активности BRAF;
- (b) в 8 раз более сильным в клеточном анализе pERK и
- (c) в 5 раз более сильным в анализе ингибирования пролиферации клеток.



Сравнительные данные - 3

По сравнению с соединением AA-018 в Springer et al., 2009, ТВАР-01 является:

- (a) в 7 раз более эффективным на мутантном по BRAF ксенотрансплантате меланомы A375M при максимально эффективной дозе и
- (b) характеризуется в 2 раза более высокой пероральной биодоступностью.



Сравнительные данные - 4

По сравнению с соединением AA-019 в Springer et al., 2009, ТВАР-01 является:

- (a) переносимым *in vivo* при более высоких в 2 раза дозах (т.е. 40-50 мг/кг), несмотря на наличие более высокой C_{max} и AUC, чем у AA-019 в той же дозе;
- (b) до 16 раз более сильным при ингибировании пролиферации клеток на BRAF-мутантных наивных или с приобретенной устойчивостью к лекарственным средствам клеточных линиях и мутантных по RAS клеточных линиях;
- (c) в 2 раза более растворимым (т.е. имеет в 2 раза большую термодинамическую растворимость);
- (d) в 2 раза более эффективным на мутантном по BRAF ксенотрансплантате меланомы A375M и мутантном по BRAF ксенотрансплантате меланомы WM266.4 при максимально эффективной дозе;
- (e) в 1,2 раза более эффективным на мутантном по RAS колоректальном ксенотрансплантате SW620

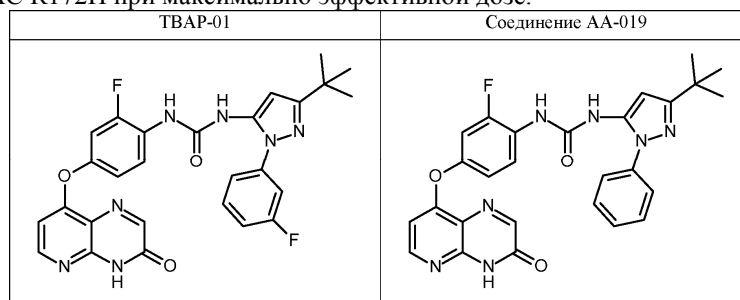
при максимально эффективной дозе;

(f) в 1,2-1,5 раза более эффективным на полученном от пациента с устойчивостью к вемурафенибу мутантном по BRAF ксенотрансплантате меланомы RM-2 (LINE 2) и мутантном по BRAF ксенотрансплантате меланомы A375R при максимально эффективной дозе и

(g) в 2,4 раза более эффективным на полученном от пациента с устойчивостью к дабрафенибу+траметинибу мутантном по BRAF ксенотрансплантате меланомы RM-17 (LINE 3) при максимально эффективной дозе.

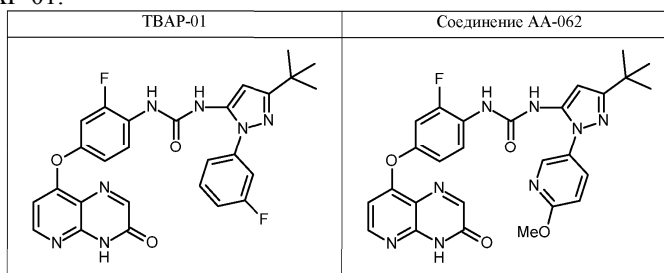
(h) в >6,5 раза более эффективным при ингибировании биомаркера pERK в аллотрансплантате поджелудочной железы PDAC R172H при максимально эффективной дозе,

(i) в 2,5 раза более эффективным при ингибировании биомаркера pSRC в аллотрансплантате поджелудочной железы PDAC R172H при максимально эффективной дозе.



Сравнительные данные - 5

По сравнению с соединением AA-062 в Springer et al., 2009, ТВАР-01 является в 9 раз более эффективным на мутантном по BRAF ксенотрансплантате меланомы A375M при максимально эффективной дозе. Это удивительно и неожиданно, поскольку AA-062 имеет в 5 раз большую C_{max} и в 12 раз большую AUC по сравнению с ТВАР-01.



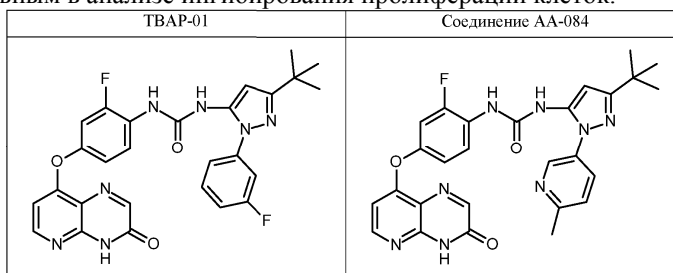
Сравнительные данные - 6

По сравнению с соединением AA-084 в Springer et al., 2009, ТВАР-01 является:

(a) в 11 раз более сильным в анализе киназной активности BRAF;

(b) в 8 раз более сильным в клеточном анализе pERK и

(c) в 5 раз более сильным в анализе ингибирования пролиферации клеток.



Вышеизложенное описывает принципы, предпочтительные варианты осуществления и режимы работы настоящего изобретения. Тем не менее, настоящее изобретение не должно быть истолковано как ограниченное конкретными обсужденными вариантами осуществления. Вместо этого вышеописанные варианты осуществления следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничительные. Следует понимать, что изменения могут быть сделаны в этих вариантах осуществления специалистами в данной области без отступления за пределы объема настоящего изобретения.

Ссылки

Ряд публикаций цитируется в данном документе для того, чтобы более полно описать и раскрыть настоящее изобретение и существующий уровень техники, к которому относится настоящее изобретение. Полные ссылки на данные источники представлены ниже. Каждый из источников данного документа включен посредством ссылки во всей своей полноте в настоящее раскрытие в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка конкретно и индивидуально указывалась для включения посредством ссылки.

- Akula *et al.*, 2004, "Raf promotes human herpesvirus-8 (HHV-8/KSHV) infection", Oncogene, Vol. 23, pp. 5227-5241.
- Alitalo *et al.*, 1996, "Promoter for the receptor tyrosine kinase, Tie", U.S. Patent No. 5,877,020 granted 02 March 1999.
- Alon *et al.*, 1995, "Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity", Nature Med., Vol. 1, pp. 1024-1028.
- Anastasaki *et al.*, 2012, "Continual low-level MEK inhibition ameliorates cardio-facio-cutaneous phenotypes in zebrafish", Disease Models & Mechanisms, Vol. 5, pp. 546-552.
- Antony *et al.*, 2013, "C-RAF Mutations Confer Resistance to RAF Inhibitors", Cancer Research, Vol. 73, pp. 4840-4851.
- Arcaini *et al.*, 2012, "The *BRAF* V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms", Blood, Vol. 119, pp. 188-191.
- Asrih *et al.*, 2013, "Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in multifactorial adverse cardiac remodeling associated with Metabolic Syndrome", Mediators of Inflammation, Vol. 2013, Article ID No. 367245.
- Badalian-Very *et al.*, 2011, "Recent advances in the understanding of Langerhans cell histiocytosis", British Journal of Haematology, Vol. 156, pp. 163-172.
- Belgore *et al.*, 2004, "Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries", J. Clin. Pathol., Vol. 57, pp. 266-272.
- Benn *et al.*, 1994, "Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade", PNAS, Vol. 91, pp. 10350-10354.
- Berry *et al.*, 2007, "TNF-alpha in asthma", Curr. Opin. Pharmacol., Vol. 7, No. 3, pp. 279-282.
- Bos *et al.*, 1989, "Ras oncogenes in human cancer: a review", Cancer Research, Vol. 49, pp. 4682-4689.
- Bridges *et al.*, 2000, "Treatment of asthma with MEK inhibitors ", international (PCT) patent application publication number WO 00/40235, published 13 July 2000.
- Byeon *et al.*, 2012, "The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses", Mediators of Inflammation, Vol. 2012, Article ID No. 512926.
- Calhoun *et al.*, 2003, "BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) Mutations in Distinct Subsets of Pancreatic Cancer", American Journal of Pathology, Vol. 163, pp. 1255-1260.

- Cantin *et al.*, 2007, "Pyrazolyl urea derivatives useful in the treatment of cancer", international (PCT) patent application publication number WO 2007/059202 A2, published 24 May 2007.
- Cantrell, 2003, "GTPases and T cell activation", Immunol. Rev., Vol. 192, pp. 122-130.
- Chan *et al.*, 1996, "Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases", Curr. Opin. Immunol., Vol. 8, No. 3, pp. 394-401.
- Chapman *et al.*, 2011, "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation", New England Journal of Medicine, Vol. 364, pp. 2507-2516.
- Chapman *et al.*, 2011, "Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma", Nature, Vol. 471, pp. 467-472.
- Chun *et al.*, 2002, "Pharmaceutical composition for prevention and treatment of joint arthritis and a screening method thereof", international patent publication number WO 02/102367, published 27 February 2002.
- Ciampi *et al.*, 2005, "Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer", J. Clin. Invest., Vol. 115, pp. 94-101.
- Colville-Nash and Scott, 1992, "Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications", Ann. Rhum. Dis., Vol. 51, p. 919.
- Cooper *et al.*, 1994, "Membrane-associated tyrosine kinases as molecular switches", Semin. Cell Biol., Vol. 5, No. 6, pp. 377-387.
- Corcoran *et al.*, 2010, "BRAF Gene Amplification Can Promote Acquired Resistance to MEK Inhibitors in Cancer Cells Harboring the BRAF V600E Mutation", Sci. Signal., Vol. 3, ra84.
- Coulthard *et al.*, 2009, "p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics", Trends Mol. Med., Vol. 15, pp. 369-379.
- Courtneidge *et al.*, 1993, "The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions", Dev. Suppl., pp. 57-64.
- Cuadrado *et al.*, 2010, "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling", Biochem. J., Vol. 429, pp. 403-417.
- Damodar Reddy *et al.*, 2001, "Role of MAP kinase pathways in primitive neuroectodermal tumours", Anticancer Research, Vol. 21, pp. 2733-2738.
- Davies *et al.*, 1996, "Raf and Mitogen-activated Protein Kinase Regulate Stellate Cell Collagen Gene Expression", J. Biol. Chem., Vol. 271, pp. 11039-11042.
- Davies *et al.*, 2002, "Mutations of the BRAF gene in human cancer", Nature, Vol. 417, pp. 949-954.
- Davis *et al.*, 1994, "Tie-2 ligand 1", U.S. Patent No. 5,879,672 granted 09 March 1999.
- Davis *et al.*, 1994, "TIE-2 ligand, and method of making", U.S. Patent No. 5,521,073 granted 28 May 1996.
- Davis *et al.*, 1996, "Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning", Cell, Vol. 87, pp. 1161-1169.
- Denekamp, 1993, "Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy", Br. J. Rad., Vol. 66, pp. 181-196.
- Dhomen *et al.*, 2009, "Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice", Cancer Cell, Vol. 15, pp. 294-303.

- Dixon *et al.*, 2001, "Method for treating chronic pain using MEK inhibitors", international (PCT) patent application publication number WO 01/05392, published 25 January 2001.
- Downward *et al.*, 2003, "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy", Nature Reviews Cancer, Vol. 3, pp. 11-22.
- Dudley *et al.*, 2000, "Treatment of arthritis with MEK inhibitors", international (PCT) patent application publication number WO 00/35436, published 22 June 2000.
- Ellis *et al.*, 2008, "VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity", Nature Reviews Cancer, Vol. 8, pp. 579-591.
- Falchook *et al.*, 2012, "Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial", The Lancet, Vol. 379, pp. 1893-1901.
- Fernandes-Medarde, 2011, "Ras in Cancer and Developmental Diseases", Genes & Cancer, Vol. 2, pp. 344-358.
- Fidler and Ellis, 1994, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis", Cell, Vol. 79, pp. 185-188.
- Flaherty *et al.*, 2010, "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma", New England Journal of Medicine, Vol. 363, pp. 809-819.
- Flynn *et al.*, 2008, "Enzyme modulators and treatments", US patent application publication number US 2008/0113967 A1, published 15 May 2008.
- Folkman *et al.*, 1992, "Angiogenesis", J. Biol. Chem., Vol. 267, pp. 10931-10934.
- Folkman, 1992, "The role of angiogenesis in tumour growth", Semin. Cancer Biol., Vol. 3, pp. 65-71.
- Folkman, 1995, "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease", Nature Medicine, Vol. 1, pp. 27-31.
- Folkman, 1997, "Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview", EXS, Vol. 79, pp. 1-81.
- Friedlander *et al.*, 1995, "Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins", Science, Vol. 270, pp. 1500-1502.
- Fujita *et al.*, 2004, "ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF- α expression in renal tubular cells", Am. J. Physiol. Renal. Physiol., Vol. 286, p. F120.
- Fukuda *et al.*, 2007, "Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Mediates Transformation through Constitutive Activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway", J. Virol., Vol. 81, pp. 9299-9306.
- Furuta *et al.*, 2012, "Nitrogenated aromatic heterocyclic ring derivative", international (PCT) patent application publication number WO 2012/008564 A1, published 19 January 2012.
- Garnett *et al.*, 2004, "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene", Cancer Cell, Vol. 6, pp. 313-319.
- Gaudi *et al.*, 2011, "Molecular Bases of Cutaneous and Uveal Melanomas", Pathology Research International, Vol. 2011, Article ID No. 159421.
- Genot *et al.*, 2000, "Ras regulation and function in lymphocytes", Curr. Opin. Immunol., Vol. 12, pp. 289-294.
- Geppert *et al.*, 1994, "Lipopolysaccharide signals activation of Tumour Necrosis Factor biosynthesis through the Ras/Raf-1/MEK/MAPK pathway", Mol. Med., Vol. 1, pp. 93-103.

- Gilbertsen *et al.*, 2000, "Use of a MEK inhibitor for preventing transplant rejection", international (PCT) patent application publication number WO 00/35435, published 22 June 2000.
- Girotti *et al.*, 2013, "Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma", *Cancer Discovery*, Vol. 3, pp. 158-167.
- Godowski *et al.*, 1997, "Tie ligand homologues", U.S. Patent No. 6,030,831 granted 29 February 2000.
- Graf *et al.*, 1997, "Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Involved in Platelet-Derived Growth Factor-Directed Migration by Vascular Smooth Muscle Cells", *Hypertension*, Vol. 29, pp. 334-339.
- Gray-Schopfer *et al.*, 2007, "Melanoma biology and new targeted therapy", *Nature*, Vol. 445, pp. 851-857.
- Greger *et al.*, 2012, "Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR Inhibitors Overcome Acquired Resistance to the BRAF Inhibitor GSK2118436 Dabrafenib, Mediated by NRAS or MEK Mutations", *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 11, pp. 909-920.
- Grosios *et al.*, 2004, "Angiogenesis inhibition by the novel VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, PTK787/ZK222584, causes significant anti-arthritis effects in models of rheumatoid arthritis", *Inflamm. Res.*, Vol. 53, pp. 133-142.
- Gu *et al.*, 2013, "Use of organic compound for the treatment of Noonan syndrome", international (PCT) patent application publication number WO 2013/03133, published 07 March 2013.
- Haase *et al.*, 2001, "A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis", *J. Clin. Invest.*, Vol. 108, pp. 527-536.
- Haroche *et al.*, 2012, "High prevalence of *BRAF V600E* mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses", *Blood*, Vol. 120, pp. 2700-2703.
- Hatzivassiliou *et al.*, 2011, "Determining sensitivity of cells to B-Raf inhibitor treatment by detecting K-ras mutation and RTK expression levels", international (PCT) patent application publication number WO 2011/028540 published 10 March 2011.
- Hatzivassiliou *et al.*, 2011, "Determining sensitivity of cells to B-Raf inhibitor treatment by detecting K-ras mutation and RTK expression levels", international (PCT) patent application publication number WO 2011/028540 published 10 March 2011.
- Heidorn *et al.*, 2010, "Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumour progression through CRAF", *Cell*, Vol. 140, pp. 209-221.
- Hu *et al.*, 2011, "Mutation that blocks ATP binding creates a pseudokinase stabilizing the scaffolding function of kinase suppressor of Ras, CRAF and BRAF", *PNAS*, Vol. 108, pp. 6067-6072.
- Hwang *et al.*, 2004, "Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma", *Hepatology Research*, Vol. 29, pp. 113-121.
- Ingber *et al.*, 1990, "Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth", *Nature*, Vol. 348, pp. 555-557.
- Inoue *et al.*, 1998, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis", *Circulation*, Vol. 98, pp. 2108-2116.
- Jaffee *et al.*, 2000, "Inhibition of MAP Kinase Kinase (MEK) Results in an Anti-inflammatory Response in Vivo", *Biochem. Biophys. Res. Com.*, Vol. 268, p. 647.

- Jessen *et al.*, 2013, "MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumours", Journal of Clinical Investigation, Vol. 123, pp. 340-347.
- Ji *et al.*, 2002, "ERK MAP Kinase Activation in Superficial Spinal Cord Neurons Induces Prodynorphin and NK-1 Upregulation and Contributes to Persistent Inflammatory Pain Hypersensitivity", J. Neurosci., Vol. 22, p. 478.
- Jo *et al.*, 2005, "MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis", Kidney Intl., Vol. 67, pp. 458-466.
- Johnson *et al.*, 2001, "The role of MKK1/2 kinase activity in human cytomegalovirus infection", J. Gen. Virol., Vol. 82, pp. 493-497.
- Kahlon *et al.*, 1992, "Angiogenesis in atherosclerosis", Can. J. Cardiol., Vol. 8, p. 60.
- Kam *et al.*, 2000, "TNF-alpha antagonists for the treatment of Crohn's disease", Expert Opin. Pharmacother., Vol. 1, pp. 615-622.
- Karim *et al.*, 2006, "Impaired inflammatory pain and thermal hyperalgesia in mice expressing neuron-specific dominant negative mitogen activated protein kinase kinase (MEK)", Mol. Pain., Vol. 2, p. 2.
- Keffer *et al.*, 1991, "Transgenic mice expressing human necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis", EMBO J., Vol. 10, No. 13, pp. 4025-4031.
- Kjetil *et al.*, 2013, "Methods and compositions for inhibition of activation of regulatory T cells", international (PCT) patent application publication number WO 2013/001372, published 03 January 2013.
- Kotoula *et al.*, 2009, "Mutational analysis of the BRAF, RAS and EGFR genes in human adrenocortical carcinomas", Endocrine-Related Cancer, Vol. 16, pp. 565-572.
- Li *et al.*, 1998, "Activation of NF-kB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for Pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells", PNAS, Vol. 95, pp. 5718-5723.
- Lin *et al.*, 2010, "VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by P2X2/3 receptor of primary sensory neurons", Brain Research Bulletin, Vol. 83, pp. 284-291.
- Lindauer *et al.*, 2012, "Dasatinib", Recent Results in Cancer Research, Vol. 184, pp. 83-102.
- Link *et al.*, 2008, "Phosphodiesterase 4 inhibition but not beta-adrenergic stimulation suppresses tumor necrosis factor-alpha release in peripheral blood mononuclear cells in septic shock", Crit. Care, Vol. 12, No. 6, R159.
- Long *et al.*, 2011, "Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma", J. Clin. Oncol., Vol. 29, No. 10, pp. 1239-1246.
- Lorenz *et al.*, 2009, "Cardiac hypertrophy: Targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol. 41, pp. 2351-2355.
- Lowenberg *et al.*, 2005, "Specific Inhibition of c-Raf Activity by Semapimod Induces Clinical Remission in Severe Crohn's Disease", J. Immunol., Vol. 175, pp. 2293-2300.
- Luo *et al.*, 2002, "Coxsackievirus B3 Replication Is Reduced by Inhibition of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway", J. Virol., Vol. 76, pp. 3365-3373.
- Ma *et al.*, 2005, "The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain", Expert Opin Ther Targets, Vol. 9, p. 699.

- Maddahi *et al.*, 2010, "Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway", J. Neuroinflammation, Vol. 7, pp. 1-14.
- Mammas *et al.*, 2005, "Involvement of the ras genes in female genital tract cancer (Review)", International Journal of Oncology, Vol. 26, pp. 1241-1255.
- Martich *et al.*, 1991, "Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents", J. Exp. Med., Vol. 173, pp 1021-1024.
- Martin *et al.*, 2010, "Update on lymphocyte specific kinase inhibitors: a patent survey", Expert Opin. Ther. Pat., Vol. 20, pp. 1573-1593.
- Masabumi *et al.*, 2013, "Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases", J. Biochem., Vol. 153, pp. 13-19.
- McCann *et al.*, 2010, "Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis", Arthritis Res. Ther., Vol. 12, No. 3, R107.
- McKay *et al.*, 2011, "Complexity in KSR function revealed by Raf inhibitor and KSR structure studies", Small GTPases, Vol. 2, pp. 276-281.
- McMahon *et al.*, 2000, "VEGF receptor signaling in tumour angiogenesis", The Oncologist, Vol. 5, pp. 3-10.
- Mei *et al.*, 2006, "Distribution, levels and phosphorylation of Raf-1 in Alzheimer's disease", J. Neurochem., Vol. 99, pp. 1377-1388.
- Mercer *et al.*, 2006, "Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD", Int. J. of COPD, Vol. 1, pp. 137-150.
- Metzner *et al.*, 2012, "Fibroblast Growth Factor Receptors as Therapeutic Targets in Human Melanoma: Synergism with BRAF Inhibition", Journal of Investigative Dermatology, Vol. 131, pp. 2087-2095.
- Meyers *et al.*, 1996, "FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing", Am. J. Hum. Genet., Vol. 58, pp. 491-498.
- Milella *et al.*, 2001, "Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia", Journal of Clinical Investigation, Vol. 108, pp. 851-859.
- Miura *et al.*, 2004, "Simvastatin suppresses coronary artery endothelial tube formation by disrupting Ras/Raf/ERK signaling", Atherosclerosis, Vol. 175, pp. 235-243.
- Montagut *et al.*, 2008, "Elevated CRAF as a Potential Mechanism of Acquired Resistance to BRAF Inhibition in Melanoma", Cancer Research, Vol. 68, pp. 4853-4861.
- Mukherjee *et al.*, 2005, "Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer", Prostate, Vol. 64, pp. 101-107.
- Mukhopadhyay *et al.*, 2006, "Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology", Respir. Res., Vol. 7, p. 125.
- Murray *et al.*, 2011, "Respiratory formulations and compounds for use therein", international (PCT) patent application publication number WO 2011/158044 A2, published 22 December 2011.

- Mustonen *et al.*, 1995, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis", J. Cell Biol., Vol. 129, pp. 895-898.
- Nakamura *et al.*, 2006, "Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules", World J. Gastroenterol., Vol. 12, pp. 4628-4235.
- Nazarian *et al.*, 2010, "Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation", Nature, Vol. 468, pp. 973-979.
- Niculescu-Duvaz *et al.*, 2006, "Imidazo[4,5-b]pyridin-2-one and oxazolo[4,5-b]pyridin-2-one compounds and analogs thereof as therapeutic compounds", international (PCT) patent application publication number WO 2006/043090 A1, published 27 April 2006.
- Niculescu-Duvaz *et al.*, 2007, "Imidazo[4,5-b]pyridin-2-one and oxazolo[4,5-b]pyridin-2-one compounds and analogs thereof as therapeutic compounds", international (PCT) patent application publication number WO 2007/125330 A1, published 08 November 2007.
- Niculescu-Duvaz *et al.*, 2009, "Aryl-quinolyl compounds and their use", international (PCT) patent application publication number WO 2009/130487 A1, published 29 October 2009.
- O'Reilly *et al.*, 1994, "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.", Cell, Vol. 79, pp. 315-328.
- Oeztuerk-Winder *et al.*, 2012, "The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation", Biochem. J., Vol. 445, pp. 1-10.
- Ozawa *et al.*, 2001, "Growth factors and their receptors in pancreatic cancer", Teratog. Carcinog. Mutagen., Vol. 21, pp. 27-44.
- Palanisamy *et al.*, 2010, "Rearrangements of the RAF Kinase Pathway in Prostate Cancer, Gastric Cancer and Melanoma", Nat. Med., Vol. 16, pp. 793-798.
- Partanen *et al.*, 1992, "A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains", Mol. Cell Biol., Vol. 12, pp. 1698-1707.
- Partanen *et al.*, 1999, "Functions of Tie1 and Tie2 Receptor Tyrosine Kinases in Vascular Development", Curr. Topics Microbiol. Immunol., Vol. 237, pp. 159-172.
- Paulson *et al.*, 1995, "Receptor tyrosine kinases and the regulation of hematopoiesis", Semin. Immunol., Vol. 7, No. 4, pp. 267-277.
- Payne *et al.*, 2001, "Human Papillomavirus Type 6b Virus-Like Particles Are Able To Activate the Ras-MAP Kinase Pathway and Induce Cell Proliferation", J. Virol., Vol. 75, pp. 4150-4157.
- Peacock *et al.*, 1992, "Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis", J. Exp. Med., Vol. 175, pp. 1135-1138.
- Peacock *et al.*, 1995, "A novel angiogenesis inhibitor suppresses rat adjuvant arthritis", Cell. Immunol., Vol. 160, pp. 178-184.
- Pelletier *et al.*, 2003, "In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes", Arthritis & Rheumatism, Vol. 48, p. 1582-1593.
- Peters, 1998, "Vascular Endothelial Growth Factor and the Angiopoietins: Working Together to Build a Better Blood Vessel", Circ. Res., Vol. 83, No. 3, pp. 342-343.

- Petrovan *et al.*, 2007, "DNA Vaccination Against VEGF Receptor 2 Reduces Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice", Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Vol. 27, pp. 1095-1100.
- Pinedo *et al.*, 2000, "The Role of VEGF in Tumour Angiogenesis", The Oncologist, Vol. 5, pp. 1-2.
- Pinner *et al.*, 2009, "CD44 splice variants in neurodegenerative diseases", international (PCT) patent application publication number WO 2009/007934, published 15 January 2009.
- Planz *et al.*, 2001, "MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells", J. Virol., Vol. 75, pp. 4871-4877.
- Pleschka *et al.*, 2001, "Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade", Nature Cell Biology, Vol. 3, pp. 301-305.
- Plomp *et al.*, 1998, "Pfeiffer syndrome type 2: further delineation and review of the literature", Am. J. Med. Genet., Vol. 75, pp. 245-251.
- Poulikakos *et al.*, 2010, "RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF", Nature, Vol. 464, pp. 427-430.
- Poulikakos *et al.*, 2011, "RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)", Nature, Vol. 480, pp. 387-390.
- Powers *et al.*, 2000, "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling", Endocr. Relat. Cancer, Vol. 7, pp. 165-197.
- Riva *et al.*, 1995, "Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: Implication in drug and radioresistance", European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology, Vol. 31, pp. 384-391.
- Rotsos *et al.*, 2008, "Cystoid macular edema", Clin. Ophthalmol., Vol. 2, pp. 919-930.
- Rubinstein *et al.*, 2010, "Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032", J. Transl. Med., Vol. 8, p. 67.
- Salama *et al.*, 2013, "BRAF in Melanoma: Current strategies and future directions", Clinical Cancer Research, Vol. 19, No. 16, pp. 4326-4334.
- Schindler *et al.*, 2011, "Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumours reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma", Acta Neuropathologica, Vol. 121, pp. 397-405.
- Schreck *et al.*, 2006, "Raf kinases: Oncogenesis and drug discovery", International Journal of Cancer, Vol. 119, pp. 2261-2271.
- Shakhov *et al.*, 1990, "Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages", J. Exp. Med., Vol. 171, pp. 35-47.
- Shapira *et al.*, 1996, "Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion", Infect. Immun., Vol. 64, No. 3, pp. 825-828.
- Shi *et al.*, 2012, "Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance", Nature Commun., Vol. 3, p. 724.

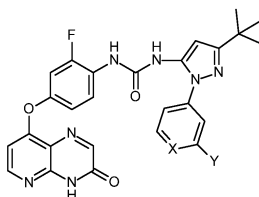
- Sievert *et al.*, 2013 "Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas", PNAS, Vol. 110, pp. 5957-5962.
- Smalley *et al.*, 2009, "CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations", Oncogene, Vol. 28, pp. 85-94.
- Smith *et al.*, 2007, "Urea compounds useful in the treatment of cancer", international (PCT) patent application publication number WO 2007/064872 A2, published 07 June 2007.
- Smith *et al.*, 2010, "Vascular Endothelial Growth Factor Receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 Are Localized Primarily to the Vasculature in Human Primary Solid Cancers", Clin. Cancer Res., Vol. 16, pp. 3548-3561.
- Solit *et al.*, 2006, "BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition", Nature, Vol. 439, pp. 358-362.
- Song *et al.*, 2005, "Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats", Acta Pharmacol Sin., Vol. 26, p. 789.
- Sosman *et al.*, 2012, "Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib", New England Journal of Medicine, Vol. 366, pp. 707-714.
- Springer *et al.*, 2009, "Pyrido[2,3-b]pyrazine-8-substituted compounds and their use", international (PCT) patent application publication number WO 2009/077766 A1, published 25 June 2009.
- Springer *et al.*, 2011, "1-(5-tert-Butyl-2-phenyl-2H-Пипразол-3-yl)-3-[2-fluoro-4-(1-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yloxy)-phenyl]urea and related compounds and their use in therapy", international (PCT) patent application publication number WO 2011/092469 A1, published 04 August 2011.
- Stratton *et al.*, 2003, "Genes", international (PCT) patent application publication number WO 03/056036 A2 published 10 July 2003.
- Straussman *et al.*, 2012, "Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion", Nature, Vol. 487, pp. 500-506.
- Suijkerbuijk *et al.*, 2010, "Development of novel, highly potent inhibitors of V-RAF murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF): increasing cellular potency through optimization of a distal heteroaromatic group", J. Med. Chem., Vol. 53, pp. 2741-2756.
- Sullivan *et al.*, 2011, "BRAF in melanoma: pathogenesis, diagnosis, inhibition, and resistance", J. Skin Cancer, Vol. 2011, Article ID No. 423239.
- Suri *et al.*, 1996, "Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis", Cell, Vol. 87, pp. 1171-1180.
- Tam *et al.*, 2009, "Blockade of VEGFR2 and Not VEGFR1 Can Limit Diet-Induced Fat Tissue Expansion: Role of Local versus Bone Marrow-Derived Endothelial Cells", PLoS One, Vol. 4, e4974.
- Taraboletti *et al.*, 1995, "Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases", J. Natl. Cancer Inst., Vol. 87, p. 293.
- Thalhamer *et al.*, 2008, "MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation", Rheumatology, Vol. 47, pp. 409-414.
- Vergani *et al.*, 2011, " Identification of MET and SRC activation in melanoma cell lines showing primary resistance to PLX4032", Neoplasia, Vol. 13, pp. 1132-1142.

- Vikkula *et al.*, 2004, "Medical use of ras antagonists for the treatment of capillary malformation", international (PCT) patent application publication number WO 2004/083458, published 30 September 2004.
- Villanueva *et al.*, 2011, "Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K", Cancer Cell, Vol. 18, pp. 683-695.
- Wan *et al.*, 2004, "Mechanism of activation of RAF-ERK signalling pathway by oncogenic mutations in B-RAF", Cell, Vol. 116, pp. 855-867.
- Wang *et al.*, 1997, "Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoural angiogenesis and tumour growth", Nature Medicine, Vol. 3, pp. 887-893.
- Wang *et al.*, 2003, "Significant Neuroprotection against Ischemic Brain Injury by Inhibition of the MEK1 Protein Kinase in Mice: Exploration of Potential Mechanism Associated with Apoptosis", J. Pharmacol. Exp. Ther., Vol. 304, p. 172.
- Wang *et al.*, 2004, "Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia", Brain Res., Vol. 996, p. 55.
- Ward *et al.*, 2012, "Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies", Blood, Vol. 120, pp. 3397-3406.
- Wellbrock *et al.*, 2004, "V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes", Cancer Research, Vol. 64, pp. 2338-2342.
- Whittaker *et al.*, 2010, "A novel, selective and efficacious nanomolar pyridopyrazinone inhibitor of V600EBRAF", Cancer Research, Vol. 70, No. 20, pp. 8036-8044.
- Wilks *et al.*, 1990, "Structure and function of the protein tyrosine kinases", Progress in Growth Factor Research, Vol. 2, pp. 97-111.
- Wilson *et al.*, 2012, "Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors", Nature, Vol. 487, pp. 505-509.
- Xing, 2013, "Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer", Nature Reviews Cancer, Vol. 13, pp. 184-199.
- Yancopoulos *et al.*, 1998, "Vasculogenesis, Angiogenesis, and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border", Cell, Vol. 93, pp. 661-664.
- Yang *et al.*, 1999, "Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity by the ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway", J. Virol., Vol. 73, pp. 3460-3466.
- Yao *et al.*, 1997, "Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun and NF-kappaB transcription factors", J. Biol. Chem., Vol. 272, pp. 17795-17801.
- Yeatman *et al.*, 2004, "A renaissance for SRC", Nature Reviews Cancer, Vol. 4, pp. 470-480.
- Young *et al.*, 2009, "Ras signaling and therapies", Advances in Cancer Research, Vol. 102, pp. 1-17.
- Yu *et al.*, 2000, "Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand binding specificity in Apert syndrome", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, pp. 14536-14541.
- Zamboni *et al.*, 2010, "Novel hinge binder improves activity and pharmacokinetic properties of BRAF inhibitors", J. Med. Chem., Vol. 53, No. 15, pp. 5639-5655.

- Zennadi *et al.*, 2012, "Methods of treating hemoglobinopathies", international (PCT) patent application publication number WO 2012/149547, published 01 November 2012.
- Zhang *et al.*, 2012, "Activation of the Ras/Raf/MEK Pathway Facilitates Hepatitis C Virus Replication via Attenuation of the Interferon-JAK-STAT Pathway", *J. Virol.*, Vol. 86, pp. 1544-1554.
- Zhang *et al.*, 2012, "Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph", *Trends Pharmacol. Sci. Med.*, Vol. 33, pp. 122-128.
- Zouki *et al.*, 2000, "Peroxyntirite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway", *FASEB J.*, Vol. 15, pp. 25-27.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, выбранное из соединений следующей формулы и их фармацевтически приемлемых солей:



где

- =X- независимо представляет собой =CH- или =N-;
- Y независимо представляет собой -Y¹, -Y², -Y³, -Y⁴ или -Y⁵;
- Y¹ независимо представляет собой -F, -Cl, -Br или -I;
- Y² независимо представляет собой -Me, -Et, -н-Pr или -изо-Pr;
- Y³ независимо представляет собой -CH₂F, -CHF₂ или -CF₃;
- Y⁴ представляет собой -OH и
- Y⁵ независимо представляет собой -O-Me, -O-Et, -O-н-Pr или -O-изо-Pr.

2. Соединение по п.1, где =X- представляет собой =CH-.

3. Соединение по п.1, где =X- представляет собой =N-.

4. Соединение по любому из пп.1-3, где -Y представляет собой -Y¹.

5. Соединение по любому из пп.1-3, где -Y представляет собой -Y².

6. Соединение по любому из пп.1-3, где -Y представляет собой -Y³.

7. Соединение по любому из пп.1-3, где -Y представляет собой -Y⁴.

8. Соединение по любому из пп.1-3, где -Y представляет собой -Y⁵.

9. Соединение по любому из пп.1-8, где -Y¹, если присутствует, представляет собой -F.

10. Соединение по любому из пп.1-8, где -Y¹, если присутствует, представляет собой -Cl.

11. Соединение по любому из пп.1-8, где -Y¹, если присутствует, представляет собой -Br.

12. Соединение по любому из пп.1-8, где -Y¹, если присутствует, представляет собой -I.

13. Соединение по любому из пп.1-12, где -Y², если присутствует, независимо представляет собой -Me или -Et.

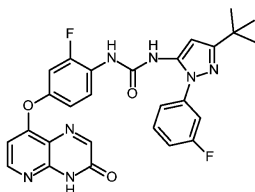
14. Соединение по любому из пп.1-12, где -Y², если присутствует, представляет собой -Me.

15. Соединение по любому из пп.1-14, где -Y³, если присутствует, представляет собой -CF₃.

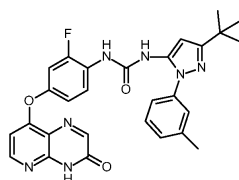
16. Соединение по любому из пп.1-15, где -Y⁵, если присутствует, независимо представляет собой -O-Me или -O-Et.

17. Соединение по любому из пп.11-15, где -Y⁵, если присутствует, представляет собой -O-Me.

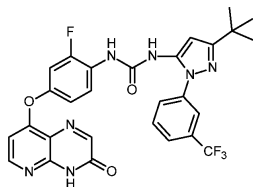
18. Соединение по п.1, выбранное из следующих соединений и их фармацевтически приемлемых солей:



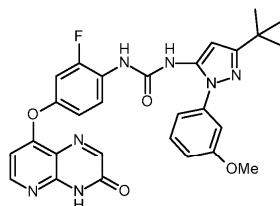
(TBAP-01),



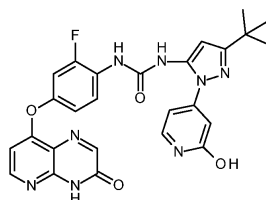
(TBAP-02),



(TBAP-03),

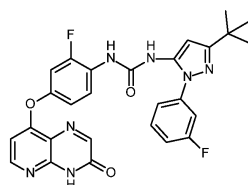


(TBAP-04) и



(TBAP-05).

19. Соединение по п.1, выбранное из следующего соединения и его фармацевтически приемлемых солей:



(TBAP-01).

20. Композиция для ингибирования RAF, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп.1-19 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

21. Композиция для лечения нарушения, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп.1-19 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, где нарушение представляет собой злокачественную меланому; рак ободочной и прямой кишки; метастатический рак ободочной и прямой кишки; фолликулярный рак щитовидной железы; инсулярный рак щитовидной железы; сосочковый рак щитовидной железы; карциному яичников; карциному яичников низкой степени злокачественности; злокачественный ретикулоэндотелиоз; холангиокарциному; глиому низкой степени злокачественности у детей; пилочитарную астроцитому; ганглиоглиому; плеоморфную ксантоастроцитому; множественную миелому; медуллярный рак поджелудочной железы; аденокарциному протоков поджелудочной железы; рак поджелудочной железы; немелкоклеточный рак легких (NSCLC); новообразования яичника; перитонеальные новообразования; новообразования фаллопиевых труб; рак легких и ассоциированный плевральный выпот; рецидивирующий или метастатический плоскоклеточный рак головы и шеи; местнораспространенную носоглоточную карциному; глиобластому; мультиформную глиобластому; гигантоклеточную глиобластому; глиосаркому; врожденную диффузную глиому варолиева моста; связанную с HIV саркому Капоши; карциному клеток почки; метастатическую аденокарциному желудка; острый миелоидный лейкоз (AML); гепатоцеллюлярную карциному; дерматофибросаркому; медуллярный рак щитовидной железы (МТС); миелодиспластический синдром; нейрофиброматоз I типа; плексиформную нейрофибромому; нейрофибромому спинного мозга; рак молочной железы; новообразования желчных протоков; рак шейки матки; рак предстательной железы; меланому; рак мочевого пузыря; рак уретры; рак мочеточника; рак почки; рак почечной лоханки; саркому; липосаркому; рак ободочной (толстой) кишки; остеосаркому; синовиальную карциному; нейробластому или рабдомиосаркому.

22. Способ получения композиции по п.20, включающий этап смешивания соединения по любому из пп.1-19 и фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя.

23. Способ получения композиции по п.21, включающий этап смешивания соединения по любому

из пп.1-19 и фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя.

24. Способ ингибирования функции RAF в клетке *in vitro* или *in vivo*, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством соединения по любому из пп.1-19.

25. Применение соединения по любому из пп.1-19 в способе лечения нарушения, где нарушение представляет собой злокачественную меланому; рак ободочной и прямой кишки; метастатический рак ободочной и прямой кишки; фолликулярный рак щитовидной железы; инсулярный рак щитовидной железы; сосочковый рак щитовидной железы; карциному яичников; карциному яичников низкой степени злокачественности; злокачественный ретикулоэндотелиоз; холангиокарциному; глиому низкой степени злокачественности у детей; пилоцитарную астроцитому; ганглиоглиому; плеоморфную ксантоастроцитому; множественную миелому; медуллярный рак поджелудочной железы; аденокарциному протоков поджелудочной железы; рак поджелудочной железы; немелкоклеточный рак легких (NSCLC); новообразования яичника; перитонеальные новообразования; новообразования фаллопиевых труб; рак легких и ассоциированный плевральный выпот; рецидивирующий или метастатический плоскоклеточный рак головы и шеи; местнораспространенную носоглоточную карциному; глиобластому; мультиформную глиобластому; гигантоклеточную глиобластому; глиосаркому; врожденную диффузную глиому варолиева моста; связанную с HIV саркому Капоши; карциному клеток почки; метастатическую аденокарциному желудка; острый миелоидный лейкоз (AML); гепатоцеллюлярную карциному; дерматофибросаркому; медуллярный рак щитовидной железы (МТС); миелодиспластический синдром; нейрофиброматоз 1 типа; плексиформную нейрофибромому; нейрофибромому спинного мозга; рак молочной железы; новообразования желчных протоков; рак шейки матки; рак предстательной железы; меланому; рак мочевого пузыря; рак уретры; рак мочеточника; рак почки; рак почечной лоханки; саркому; липосаркому; рак ободочной (толстой) кишки; остеосаркому; синовиальную карциному; нейробластому или рабдомиосаркому.

26. Применение по п.25, где нарушение представляет собой злокачественную меланому.

27. Применение по п.25, где нарушение представляет собой рак ободочной и прямой кишки.

28. Применение по п.25, где нарушение представляет собой аденокарциному поджелудочной железы.

29. Применение по любому из пп.25-28, где нарушение ассоциировано с мутантной формой RAF.

30. Применение по п.29, где нарушение является устойчивым к лечению известным ингибитором RAF.

31. Применение по п.30, где нарушение является устойчивым к лечению вемурафенибом или дабрафенибом.

32. Применение по п.30, где нарушение является устойчивым к лечению следующей комбинацией: известный ингибитор RAF и известный ингибитор MEK.

33. Применение по п.30, где нарушение является устойчивым к лечению следующей комбинацией: вемурафениб или дабрафениб и траметиниб, селуметиниб, PD 325901, кобиметиниб или CI 1040.

34. Применение по п.30, где нарушение является устойчивым к лечению

антителом, которое связывается с CTLA-4;

антителом, которое связывается с PD-1;

антителом, которое связывается с PD-L1;

антителом или антителом-конъюгатом, которое связывается с антигенным гликопротеином меланомы NMB;

антителом, которое связывает противоопухолевый эндотелиальный маркер 1;

антителом, которое связывается с VEGF;

антителом, которое связывается с ганглиозидом GD3; или

антителом, которое связывает изоформы интегрина.

35. Применение по п.30, где нарушение является устойчивым к лечению ипилимумабом; пембролизумабом; ниволумабом; MEDI4736; MPDL3280A; глембатумумабом ведотином; онтуксизумабом; бевацизумабом; KW-2871 или интетумумабом.

36. Применение соединения по любому из пп.1-19 для изготовления лекарственного средства для лечения нарушения, где нарушение представляет собой злокачественную меланому; рак ободочной и прямой кишки; метастатический рак ободочной и прямой кишки; фолликулярный рак щитовидной железы; инсулярный рак щитовидной железы; сосочковый рак щитовидной железы; карциному яичников; карциному яичников низкой степени злокачественности; злокачественный ретикулоэндотелиоз; холангиокарциному; глиому низкой степени злокачественности у детей; пилоцитарную астроцитому; ганглиоглиому; плеоморфную ксантоастроцитому; множественную миелому; медуллярный рак поджелудочной железы; аденокарциному протоков поджелудочной железы; рак поджелудочной железы; немелкоклеточный рак легких (NSCLC); новообразования яичника; перитонеальные новообразования; новообразования фаллопиевых труб; рак легких и ассоциированный плевральный выпот; рецидивирующий или метастатический плоскоклеточный рак головы и шеи; местнораспространенную носоглоточную карциному; глиобластому; мультиформную глиобластому; гигантоклеточную глиобластому; глиосаркому; врожденную диффузную глиому варолиева моста; связанную с HIV саркому Капоши; карциному клеток почки; метастатическую аденокарциному желудка; острый миелоидный лейкоз (AML); гепатоцеллюлярную карци-

ному; дерматофибросаркому; медуллярный рак щитовидной железы (МТС); миелодиспластический синдром; нейрофиброматоз 1 типа; плексиформную нейрофибромому; нейрофибромому спинного мозга; рак молочной железы; новообразования желчных протоков; рак шейки матки; рак предстательной железы; меланому; рак мочевого пузыря; рак уретры; рак мочеоточника; рак почки; рак почечной лоханки; саркому; липосаркому; рак ободочной (толстой) кишки; остеосаркому; синовиальную карциному; нейробластому или рабдомиосаркому.

37. Применение по п.36, где нарушение представляет собой злокачественную меланому.

38. Применение по п.36, где нарушение представляет собой рак ободочной и прямой кишки.

39. Применение по п.36, где нарушение представляет собой аденокарциному поджелудочной железы.

40. Применение по любому из пп.36-39, где нарушение ассоциировано с мутантной формой RAF.

41. Применение по п.40, где нарушение является устойчивым к лечению известным ингибитором RAF.

42. Применение по п.40, где нарушение является устойчивым к лечению вемурафенибом или дабрафенибом.

43. Применение по п.40, где нарушение является устойчивым к лечению следующей комбинацией: известный ингибитор RAF и известный ингибитор MEK.

44. Применение по п.40, где нарушение является устойчивым к лечению следующей комбинацией: вемурафениб или дабрафениб и траметиниб, селуметиниб, PD 325901, кобиметиниб или CI 1040.

45. Применение по п.40, где нарушение является устойчивым к лечению

антителом, которое связывается с CTLA-4;

антителом, которое связывается с PD-1;

антителом, которое связывается с PD-L1;

антителом или антителом-конъюгатом, которое связывается с антигенным гликопротеином меланомы NMB;

антителом, которое связывает противоопухолевый эндотелиальный маркер 1;

антителом, которое связывается с VEGF;

антителом, которое связывается с ганглиозидом GD3; или

антителом, которое связывает изоформы интегрина.

46. Применение по п.40, где нарушение является устойчивым к лечению ипилимумабом; пембролизумабом; ниволумабом; MEDI4736; MPDL3280A; глембатумумабом ведотином; онтуксизумабом; бевацизумабом; KW-2871 или интетумумабом.

47. Способ лечения нарушения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-19, где нарушение представляет собой злокачественную меланому; рак ободочной и прямой кишки; метастатический рак ободочной и прямой кишки; фолликулярный рак щитовидной железы; инсулярный рак щитовидной железы; сосочковый рак щитовидной железы; карциному яичников; карциному яичников низкой степени злокачественности; злокачественный ретикулоэндотелиоз; холангиокарциному; глиому низкой степени злокачественности у детей; пилоцитарную астроцитому; ганглиоглиому; плеоморфную ксантоастроцитому; множественную миелому; медуллярный рак поджелудочной железы; аденокарциному протоков поджелудочной железы; рак поджелудочной железы; немелкоклеточный рак легких (NSCLC); новообразования яичника; перитонеальные новообразования; новообразования фаллопиевых труб; рак легких и ассоциированный плевральный выпот; рецидивирующий или метастатический плоскоклеточный рак головы и шеи; местнораспространенную носоглоточную карциному; глиобластому; мультиформную глиобластому; гигантоклеточную глиобластому; глиосаркому; врожденную диффузную глиому варолиева моста; связанную с HIV саркому Капоши; карциному клеток почки; метастатическую аденокарциному желудка; острый миелоидный лейкоз (AML); гепатоцеллюлярную карциному; дерматофибросаркому; медуллярный рак щитовидной железы (МТС); миелодиспластический синдром; нейрофиброматоз 1 типа; плексиформную нейрофибромому; нейрофибромому спинного мозга; рак молочной железы; новообразования желчных протоков; рак шейки матки; рак предстательной железы; меланому; рак мочевого пузыря; рак уретры; рак мочеоточника; рак почки; рак почечной лоханки; саркому; липосаркому; рак ободочной (толстой) кишки; остеосаркому; синовиальную карциному; нейробластому или рабдомиосаркому.

48. Способ по п.47, где нарушение представляет собой злокачественную меланому.

49. Способ по п.47, где нарушение представляет собой рак ободочной и прямой кишки.

50. Способ по п.47, где нарушение представляет собой аденокарциному поджелудочной железы.

51. Способ по любому из пп.47-50, где нарушение ассоциировано с мутантной формой RAF.

52. Способ по п.51, где нарушение является устойчивым к лечению известным ингибитором RAF.

53. Способ по п.51, где нарушение является устойчивым к лечению вемурафенибом или дабрафенибом.

54. Способ по п.51, где нарушение является устойчивым к лечению следующей комбинацией: известный ингибитор RAF и известный ингибитор MEK.

55. Способ по п.51, где нарушение является устойчивым к лечению следующей комбинацией: вему-

рафениб или дабрафениб и траметиниб, селуметиниб, PD 325901, кобиметиниб или CI 1040.

56. Способ по п.51, где нарушение является устойчивым к лечению

антителом, которое связывается с CTLA-4;

антителом, которое связывается с PD-1;

антителом, которое связывается с PD-L1;

антителом или антителом-конъюгатом, которое связывается с антигенным гликопротеином меланомы NMB;

антителом, которое связывает противоопухолевый эндотелиальный маркер 1;

антителом, которое связывается с VEGF;

антителом, которое связывается с ганглиозидом GD3; или

антителом, которое связывает изоформы интегрина.

57. Способ по п.51, где нарушение является устойчивым к лечению ипилимумабом; пембролизумабом; ниволумабом; MEDI4736; MPDL3280A; глмбатумумабом ведотином; онтуксизумабом; бевацизумабом; KW-2871 или интетумумабом.

