

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190125** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.05.24

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.06.26

(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИДОПИРИМИДИНОНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ Ax1**

(31) **62/690,620**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.06.27**

**Ким Дзунг-Хо, Чой Дзанг-Сик, Ли Хее
Киу, Дзунг Донг-Сик, Парк Сунг-Хо,
Чой Юнг-Геун (KR)**

(33) **US**

(86) **PCT/KR2019/007733**

(87) **WO 2020/004938 2020.01.02**

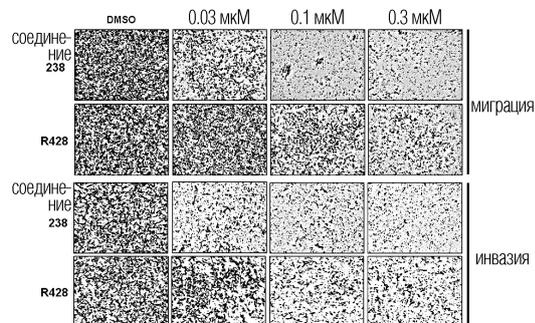
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ОСКОТЕК ИНК. (KR)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты производные пиридопиримидинона и фармацевтические композиции, содержащие их, для применения в качестве ингибитора Ax1 для лечения заболевания или состояния, опосредованного Ax1, такого как множественные типы рака и метастазы. Также раскрыты способы лечения Ax1-опосредованного заболевания или состояния путем введения субъекту терапевтически эффективного количества производных пиридопиримидинона.



A1

202190125

202190125

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566161EA/20

ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИДОПИРИМИДИНОНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ Axl

Область техники

Настоящее изобретение относится к производным пиридопиримидинона и содержащим их композициям, которые можно применять в качестве ингибиторов Axl для лечения заболевания или состояния, опосредованного Axl.

Уровень техники

Протеинкиназы играют центральную роль в регуляции широкого спектра клеточных процессов и поддержании контроля над клеточной функцией. Протеинкиназы катализируют и регулируют процесс фосфорилирования, посредством чего киназы ковалентно присоединяют фосфатные группы к белкам или липидным мишеням в ответ на различные внеклеточные сигналы. Внеклеточные стимулы, такие как гормоны, нейротрансмиттеры, факторы роста и дифференцировки, события клеточного цикла, стрессы окружающей среды и пищевые стрессы, могут влиять на один или более клеточных ответов, связанных с ростом, миграцией, дифференцировкой, секрецией гормонов, активацией факторов транскрипции, сокращением мышц, метаболизмом глюкозы, контролем синтеза белка и регуляцией клеточного цикла.

Axl является членом семейства рецепторных тирозинкиназ TAM (Tyro3-Axl-Mer), которые при активации могут регулировать выживаемость, пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток, ангиогенез и взаимодействия опухоль-хозяин. Сверхэкспрессия Axl была описана при множественных злокачественных новообразованиях эпителиального и гематологического происхождения и часто связана с плохим прогнозом. Более того, экспрессия Axl связана с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT), частым признаком метастатических опухолей, часто коррелирующим с лекарственной устойчивостью.

Большая часть передачи сигналов Axl происходит зависимым от лиганда образом, опосредованным специфичным для останковки роста белком (GAS6). После связывания GAS6 с Axl, Axl впоследствии активирует последующие сигнальные пути, такие как фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), саркома RAt (RAS) и киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (ERK). При раке сигнализация Axl может быть активирована GAS6 аутокринным или паракринным способом.

Клинически Axl высоко экспрессируется в первичных опухолях и метастазах по сравнению с нормальными тканями. Иммуногистохимический анализ первичных опухолей показал, что экспрессия Axl коррелирует с метастазами и/или плохой выживаемостью у пациентов с аденокарциномой легкого, мультиформной глиобластомой, раком молочной железы, раком панкреатической железы, почечно-клеточным раком, эзофагеальным раком, плоскоклеточным раком полости рта, мезотелиомой плевры, аденокарциномой яичников, раком толстой кишки, плоскоклеточным раком головы и шеи,

уротелиальной карциномой, раком пищевода, и гепатоцеллюлярным раком. Более того, экспрессия Ax1 коррелирует с лекарственной устойчивостью у пациентов с раком молочной железы, меланомой, миелоидным лейкозом, раком легкого и почечно-клеточным раком (см. Rankin and Giaccia, *Cancers*, 2016, 103:1-16). Таким образом, передача сигналов GAS/Ax1 как важный путь, управляющий ростом опухоли, метастазированием и лекарственной устойчивостью.

Кроме того, Ax1 является ключевым фактором, активируемым опухолевыми клетками для повышения устойчивости ко множеству принципов противораковой терапии, включая миелоидный лейкоз, немелкоклеточный рак легкого, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак пищевода и рак яичников. Например, уровень Ax1 сильно коррелирует с резистентностью к ингибитору рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) немелкоклеточного рака легкого, резистентностью к ингибитору митоген-активированных протеинкиназ (MAPK) при меланоме и ингибированием человеческого EGFR типа 2 (HER2) у больных раком молочной железы. Наиболее важно то, что генетическое и терапевтическое ингибирование Ax1 является достаточным для повышения чувствительности к этим ингибированиям, что позволяет предположить, что ингибирование Ax1 может улучшить ответ на противораковую терапию, что является эффективной стратегией для предотвращения и подавления лекарственной устойчивости и рецидивов при множественном раке.

Между тем, в публикации PCT No. WO 2013/142382 описаны производные 4-фениламино-пиридо[4,3,-d]пиримидин-5-она и их применение в качестве ингибиторов FLT3, однако в ней не раскрывается их применение в качестве ингибиторов Ax1 или для лечение Ax1-опосредованных заболеваний.

Описание изобретения

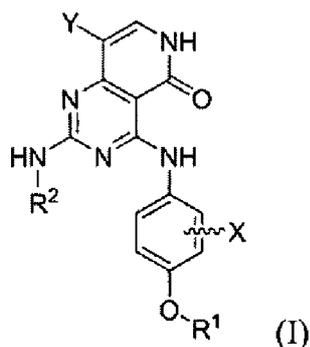
Техническая задача

Авторы настоящего изобретения изучали соединения, которые можно применять в качестве ингибитора Ax1, и осуществили настоящее изобретение, подтвердив, что производные 4-фениламино-пиридо[4,3,-d]пиримидин-5-она, имеющие определенные структуры эффективно ингибируют активность рецепторной тирозинкиназы Ax1 и, таким образом, могут эффективно применяться для лечения связанных с этим заболеваний.

Соответственно, целью настоящего изобретения является предоставление производных пиридопиримидинона и содержащих их композиций, которые пригодны в качестве ингибиторов Ax1 для лечения заболевания или состояния, опосредованного Ax1, такого как множественные типы рака и метастазы.

Решение задачи

В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет применение соединения, представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли, в качестве ингибитора Ax1 для лечение заболевания или состояния, опосредованного Ax1:



где

R^1 представляет собой C_6 - C_{10} арил, C_6 - C_{10} арил C_1 - C_6 алкил, C_5 - C_6 циклоалкил или C_5 - C_6 циклоалкилметил, необязательно замещенный одним или двумя R^3 ;

R^3 независимо представляет собой фтор, хлор, бром, йод, C_1 - C_6 алкил, или трифторметил;

X представляет собой H, фтор, хлор, бром, йод, метил или трифторэтил;

Y представляет собой хлор, бром, йод, C_1 - C_3 алкил, или фенил;

R^2 представляет собой C_3 - C_6 циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где C_3 - C_6 циклоалкил необязательно замещен по атомам углерода одним или двумя R^4 , и где 4-7-членный гетероциклоалкил имеет 1 или 2 гетероатома, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, сульфона или сульфоксида, и необязательно замещен по атому углерода R^4 или по атому азота R^5 ;

R^4 представляет собой независимо гидрокси, гидрокси C_1 - C_6 алкил, amino, amino C_1 - C_6 алкил, $-NH(-C_1-C_3$ алкил), $-N(-C_1-C_3$ алкил) $_2$, C_1 - C_3 алкил или галоген; и

R^5 представляет собой H, C_1 - C_3 алкил или $-C(=O)(-C_1-C_3$ алкил), где C_1 - C_3 алкил необязательно замещен 1-3 атомами фтора.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет применение индивидуальных стереоизомеров, смеси стереоизомеров, пролекарственных производных, защищенных производных, производных N-оксидов, сольватов или гидридов соединения формулы (I), как определено выше, в качестве ингибитора AxI для лечения заболевания или состояния, опосредованного AxI .

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет применение соединения, как определено выше, или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, опосредованного AxI .

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемую соль, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем, адьювантом или эксципиентом.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, для лечения заболевания или состояния, опосредованного AxI .

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способ лечения заболевания или состояния, опосредованного Ax1, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способ ингибирования рецепторной тирозинкиназы Ax1 или ингибирования роста раковых клеток.

Полезные эффекты изобретения

Соединение формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемая соль, и фармацевтическая композиция, включающая его, ингибируют рецепторную тирозинкиназу Ax1 и пригодны для лечения заболевания или состояния, опосредованного Ax1, например, клеточных пролиферативных заболеваний, например, несколько типов рака и метастазов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1a-1c показаны результаты анализов миграции и инвазии соединений 238 и R428.

На фиг. 2a и 2b показана противоопухолевая активность соединения 238 на сингенных моделях рака груди 4T1 *in vivo*.

На фиг. 3a-3c показана антиметастатическая активность соединения 226 на модели метастазирования легкого B16F10 *in vivo*.

На фиг. 4a и 4b показана антиметастатическая активность соединения 226 на модели перитонеальных метастазов CT26 *in vivo*.

На фиг. 5a показана модель спонтанных метастазов 4T1.

На фиг. 5b и 5c показан комбинированный эффект с антителом против PD-1 на модели ортотропных метастазов 4T1.

На фиг. 6 показано ингибирование роста опухоли на первичном участке (жировая прослойка молочной железы) в модели ортотропных метастазов 4T1.

Лучший вариант осуществления изобретения

Далее настоящее изобретение будет подробно описано.

Термин «алкил», используемый отдельно или как часть более крупного фрагмента, такого как «арилалкил» или «циклоалкил», относится к прямому или разветвленному углеводородному радикалу, имеющему от 1 до 15 атомов углерода или от 1 до 8 атомов углерода (если не указано иное) и включает, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, н-гексил и т.п. Алкил может быть незамещенным или замещен одним или более подходящими заместителями.

Термин «циклоалкил» относится к моноциклической или полициклической углеводородной кольцевой группе и включает, например, циклопропил, циклогептил, циклооктил, циклодецил, циклобутил, адамантил, норпинанил, декалинил, норборнил, циклогексил, циклопентил и тому подобное. Циклоалкильная группа может быть незамещенной или замещена одним или более подходящими заместителями.

Термин «гетеро» относится к замене по меньшей мере одного члена атома углерода

в кольцевой системе по меньшей мере одним гетероатомом, таким как азот, сера, сульфон, сульфоксид и кислород.

Термин «гетероциклоалкил» означает неароматическое моноциклическое или полициклическое кольцо, содержащее атомы углерода и водорода и по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, серы, кислорода, сульфона или сульфоксида. Гетероциклоалкильная группа может иметь одну или более двойных связей углерод-углерод или двойных связей углерод-гетероатом в кольцевой группе до тех пор, пока кольцевая группа не становится ароматической из-за их присутствия.

Примеры гетероциклоалкильных групп включают азетидинил, азиридинил, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, гомопиперазинил, морфолино, тиоморфолино, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофуранил, тетрагидропиранил, пиранил и тому подобное. Гетероциклоалкильная группа может быть незамещенной или замещена одним или более подходящими заместителями.

Используемый в настоящем описании термин «галоген» включает фтор, хлор, бром и йод.

Используемый в настоящем описании термин «алкокси» относится к алкильным группам, связанным выше через кислород, примеры которых включают метокси, этокси, изопропокси, трет-бутокси и тому подобное. Кроме того, алкокси также относится к простым полиэфирам, таким как $-O-(CH_2)_2-O-CH_3$, и тому подобное. Алкокси может быть незамещенным или замещен одним или более подходящими заместителями.

Используемый в настоящем описании термин «арил» относится к незамещенным или замещенным ароматическим моноциклическим или полициклическим группам и включает, например, фенил и нафтил. Термин «арил» также включает фенильное кольцо, конденсированное с неароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Термин «арил» может использоваться взаимозаменяемо с «арильным кольцом», «ароматической группой» и «ароматическим кольцом». Гетероарильные группы содержат от 4 до 14 атомов, от 1 до 9 из которых независимо выбраны из группы, состоящей из кислорода, серы и азота. Арил или гетероарил может быть моно- или бициклической ароматической группой. Типичные арильные и гетероарильные группы включают, например, фенил, хинолинил, индазоил, индолил, дигидробензодиоксинил, 3-хлорфенил, 2,6-дибромфенил, пиридил, пиримидинил, 3-метилпиридил, бензотиенил, 2,4,6-трибромфенил, 4-этилбензотиенил, фуранил, 3,4-диэтилфуранил, нафтил, 4,7-дихлорнафтил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тиазолил и тому подобное. Арил или гетероарил может быть незамещенным или замещен одним или более подходящими заместителями.

Используемый в настоящем описании термин «галогеналкил» относится к любому алкильному радикалу, у которого один или более атомов водорода заменены атомом галогена. Примеры галогеналкила включают $-CF_3$, $-CFH_2$, $-CF_2H$, и тому подобное.

Используемый в настоящем описании термин «гидроксил» или «гидрокси»

относится к -ОН.

Используемый в настоящем описании термин «амино» относится к $-NH_2$.

Используемый в настоящем описании термин «гидроксиалкил» относится к любому гидроксильному производному алкильного радикала. Термин «гидроксиалкил» включает любой алкильный радикал, в котором один или более атомов водорода заменены гидроксигруппой.

«Заместитель» в контексте настоящего описания относится к молекулярному фрагменту, который ковалентно связан с атомом в интересующей молекуле. Например, циклический заместитель может быть такой группой, как галоген, алкильная группа, галогеналкильная группа или другая группа, которая ковалентно связана с атомом (предпочтительно с атомом углерода или азота), который является членом кольца. Заместители ароматических групп обычно ковалентно связаны с атомом углерода кольца. Термин «замещение» относится к замене атома водорода в молекулярной структуре заместителем таким образом, чтобы валентность указанного атома не превышалась, и такое, что химически стабильное соединение (т.е. соединение, которое может быть выделено, охарактеризовано, и протестировано на биологическую активность) получается в результате замещения.

Как описано выше, определенные группы могут быть незамещенными или замещены одним или более подходящими заместителями, отличными от водорода, в одном или более доступных положениях, обычно в 1, 2, 3, 4 или 5 положениях, одной или более подходящими группами (которые могут быть одинаковыми или различными). Некоторые группы, когда они замещены, замещены 1, 2, 3 или 4 независимо выбранными заместителями. Подходящие заместители включают галоген, алкил, галогеналкил, арил, гидроксильную, алкокси, гидроксиалкил, амино и тому подобное.

Используемый в настоящем описании термин «киназа» относится к $Ax1$. Анализ киназ, содержащие описанные здесь киназы, коммерчески доступны для биохимических профилей ингибиторов киназ по их селективности. В некоторых вариантах осуществления, киназа представляет собой киназу млекопитающих, такую как киназа человека.

Используемый в настоящем описании термин «дерматологическое заболевание» относится к кожному заболеванию. Такие дерматологические расстройства включают, но не ограничиваются ими, пролиферативные или воспалительные заболевания кожи, такие как атопический дерматит, буллезные нарушения, коллагенозы, контактный дерматит, экзема, болезнь Кавасаки, розацеа, синдром Шегрена-Ларссо и крапивницу.

Используемый в настоящем описании термин «респираторное заболевание» относится к заболеваниям, поражающим органы, участвующие в дыхании, такие как нос, горло, гортань, трахея, бронхи и легкие. Респираторные заболевания включают, но не ограничиваются ими, астму, респираторный дистресс-синдром взрослых и аллергическую (внешнюю) астму, неаллергическую (внутреннюю) астму, острую тяжелую астму, хроническую астму, клиническую астму, ночную астму, аллерген-индуцированную астму,

аспирин-чувствительную астму, астму, вызванную физической нагрузкой, изокапническую гипервентиляцию, астму у детей, астму у взрослых, кашлевую астму, профессиональную бронхиальную астму, стероид-резистентную астму, сезонную астму, сезонный аллергический ринит, круглогодичный аллергический ринит, хроническую обструктивную болезнь легких, включая хронический бронхит или эмфизему, легочную гипертензию, интерстициальный фиброз легких и/или воспаление дыхательных путей и кистозный фиброз и гипоксию.

Используемый в настоящем описании термин «рак» относится к аномальному росту клеток, которые имеют тенденцию к неконтролируемому разрастанию и, в некоторых случаях, к метастазированию. Типы рака включают, но не ограничиваются ими, солидные опухоли, такие как опухоли мочевого пузыря, кишечника, мозга, груди, эндометрия, сердца, почек, легких, лимфатической ткани (лимфомы), яичников, поджелудочной железы или других эндокринных органов (щитовидной железы), предстательной железы, кожи (меланома) или гематологические опухоли (например, лейкозы).

Используемый в настоящем описании термин «воспалительные нарушения» относится к таким заболеваниям или состояниям, которые характеризуются одним или более признаками боли (воспаление, вызванное накоплением вредных веществ и стимуляцией нервов), жаром (жар, от вазодилатации), покраснением (покраснение, от вазодилатации и увеличения кровотока), отека (опухоль, от чрезмерного притока или ограниченного оттока жидкости) и потери функции, которая может быть частичной или полной, временной или постоянной. Воспаление принимает множество форм и включает, но не ограничивается этим, воспаление, которое является одним или более из следующих: острое, адгезивное, атрофическое, катаральное, хроническое, цирротическое, диффузное, диссеминированное, экссудативное, фибринозное, фиброзирующее, очаговое, гранулематозное, гиперпластическое, гипертрофическое, интерстициальное, метастатическое, некротическое, облитерирующее, паренхиматозное, пластический, продуктивное, пролиферирующее, псевдомембранозное, гнойное, склерозирующее, серозно-фибринозное, серозное, простое, специфическое, подострое, гнойное, токсическое, травматическое и/или язвенное. Воспалительные нарушения, кроме того, включают, без ограничения, поражающие кровеносные сосуды (полиартериит, темпоральный артериит); суставы (артрит: кристаллический, остео-, псориатический, реактивный, ревматоидный, синдром Рейтера); желудочно-кишечный тракт; кожу (дерматит); или несколько органов и тканей (системная красная волчанка).

Используемый в настоящем описании термин «сердечно-сосудистое заболевание» относится к заболеваниям, поражающим сердце или кровеносные сосуды или и то, и другое, включая, но не ограничиваясь этим, атеросклероз, аритмию, стенокардию, ишемию миокарда, инфаркт миокарда, сердечную или сосудистую аневризму, васкулит, инсульт, периферическую обструктивную артериопатию конечностей, органа или ткани, реперфузионное повреждение после ишемии органа или ткани, эндотоксический,

хирургический или травматический шок, гипертензию, порок клапанов сердца, сердечную недостаточность, аномальное кровяное давление, сужение сосудов, сосудистые нарушения или воспаление.

Используемый в настоящем описании термин «ингибитор» относится к соединению, которое ингибирует одну или более киназ, описанных в настоящем документе. Например, термин «ингибитор Axl» относится к соединению, которое ингибирует рецептор Axl или снижает эффект активации сигнального пути.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, такому как носитель или разбавитель, который не подавляет биологической активности или свойств соединений, описанных в настоящем документе. Такие вещества вводятся индивиду, не вызывая нежелательных биологических эффектов или не взаимодействуя вредным образом с любым из компонентов композиции, в которой они содержатся.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к композиции соединения, которая не вызывает значительного раздражения организма, в который его вводят, и не нарушает биологическую активность и свойства соединений, описанных в настоящем документе.

Используемый в настоящем описании термин «Фармацевтическая комбинация» означает продукт, полученный в результате смешивания или объединения более чем одного активного ингредиента.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси соединения, описанного в настоящем документе, с другими химическими компонентами, такими как носители, стабилизаторы, разбавители, диспергирующие агенты, суспендирующие агенты, загустители и/или эксципиенты.

Используемый в настоящем описании термин «пролекарство» относится к средству, которое превращается в активное или «исходное» лекарственное средство *in vivo*.

Используемый в настоящем описании термин «сольват» относится к комплексу переменной стехиометрии, образованному растворенным веществом (в настоящем изобретении соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль) и растворителем. Такие растворители, для реализации назначения изобретения, не должны препятствовать биологической активности растворенного соединения. Неограничивающие примеры подходящих растворителей включают, воду, ацетон, метанол, этанол и уксусную кислоту. Предпочтительно используемый растворитель представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель. Неограничивающие примеры подходящих фармацевтически приемлемых растворителей включают воду, этанол и уксусную кислоту.

Используемый в настоящем описании термин «заболевание, опосредованное протеинкиназой» или «расстройство, заболевание или состояние, опосредованное несоответствующей активностью протеинкиназы» относится к любому болезненному

состоянию, опосредованному или модулируемому протеинкиназами, описанным в настоящем документе. Такие болезненные состояния включают, но не ограничиваются ими, лимфому, остеосаркому, меланому, рак молочной железы, рак почек, рак простаты, колоректальный рак, рак щитовидной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы, нейрональный рак, рак легкого, рак матки, и рак желудочно-кишечного тракта.

Используемый в настоящем описании термин «Ax1-опосредованное заболевание» или «расстройство, заболевание или состояние, опосредованное несоответствующей активностью Ax1» относится к любому болезненному состоянию, опосредованному или модулируемому механизмами Ax1-киназы. Такие болезненные состояния включают, но не ограничиваются ими, AML, ALL, солидные опухоли, другие пролиферативные расстройства или состояние, связанные с aberrантно повышенными уровнями киназы Ax1.

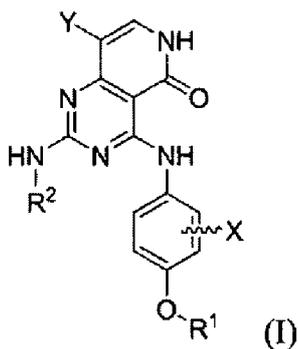
Используемый в настоящем описании термин «лечить», «лечение» или «терапия» относится к способам облегчения, ослабления или уменьшения интенсивности симптомов заболевания или состояния, предотвращения дополнительных симптомов, уменьшения или предотвращения основных метаболических причин симптомов, подавления заболевания или состояния, остановки развития заболевания или состояния, облегчения заболевания или состояния, вызывания регрессии заболевания или состояния, облегчения состояния, вызванного заболеванием или состоянием, или остановку симптомов заболевания или состояния профилактически и/или терапевтически.

Термин «нуждающийся субъект», используемый в настоящем описании, относится к любому животному, у которого развилось или может развиваться заболевание, связанное с активностью протеинкиназы, такому как обезьяна, корова, лошадь, овца, свинья, курица, индейка, перепел, кошка, собака, мышь, крыса, кролик и морская свинка, а также человек (пациент); и, в частности, это может означать млекопитающее. Кроме того, нуждающимся субъектом может быть биологический образец.

Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к достаточному количеству вводимого соединения, описанного в настоящем документе, которое в некоторой степени облегчает один или более симптомов заболевания или состояния, которое лечат. Результатом может быть уменьшение и/или облегчение признаков, симптомов или причин заболевания или любое другое желаемое изменение биологической системы. Например, «эффективное количество» для терапевтических применений представляет собой количество композиции, содержащей соединение, как раскрыто в настоящем документе, необходимое для обеспечения клинически значимого ослабления симптомов заболевания. Подходящее «эффективное» количество в любом индивидуальном случае может быть определено с использованием таких методов, как исследование с увеличением дозы. Только в качестве примера, терапевтически эффективное количество соединения формулы (I) может находиться в диапазоне, например, от примерно 0,01 мг/кг/день до примерно 100 мг/кг/день, или от примерно 0,1 мг/кг/день до примерно 10 мг/кг/день.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение соединения,

представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли, в качестве ингибитора Ax1 для лечение заболевания или состояния, опосредованного Ax1:



где

R^1 представляет собой C_6 - C_{10} арил, C_6 - C_{10} арил C_1 - C_6 алкил, C_5 - C_6 циклоалкил или C_5 - C_6 циклоалкилметил, необязательно замещенный одним или двумя R^3 ;

R^3 независимо представляет собой фтор, хлор, бром, йод, C_1 - C_6 алкил, или трифторметил;

X представляет собой H, фтор, хлор, бром, йод, метил или трифторэтил;

Y представляет собой хлор, бром, йод, C_1 - C_3 алкил или фенил;

R^2 представляет собой C_3 - C_6 циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где C_3 - C_6 циклоалкил необязательно замещен по атомам углерода одним или двумя R^4 , и где 4-7-членный гетероциклоалкил имеет 1 или 2 гетероатома, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, сульфона или сульфоксида, и необязательно замещен по атому углерода R^4 или по атому азота R^5 ;

R^4 представляет собой независимо гидрокси, гидрокси C_1 - C_6 алкил, amino, amino C_1 - C_6 алкил, $-NH(-C_1-C_3$ алкил), $-N(-C_1-C_3$ алкил) $_2$, C_1 - C_3 алкил или галоген; и

R^5 представляет собой H, C_1 - C_3 алкил или $-C(=O)(-C_1-C_3$ алкил), где C_1 - C_3 алкил необязательно замещен 1-3 атомами фтора.

В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой фенил, бензил, циклопентил, циклогексил, циклопентилметил или циклогексилметил, необязательно замещенный одним или двумя R^3 .

В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой независимо фтор, хлор, метил или изопропил.

В некоторых вариантах осуществления R^3 независимо представляет собой хлор, фтор или метил.

В некоторых вариантах осуществления R^3 независимо представляет собой хлор или фтор.

В некоторых вариантах осуществления X представляет собой фтор или метил.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой хлор, бром, йод, метил или фенил.

В дополнительных вариантах осуществления Y представляет собой хлор или бром.

В дополнительных вариантах осуществления Y представляет собой бром.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой пирролидинил или пиперидинил.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой N-метилпирролидинил или N-метилпиперидинил.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой пиперидинил или пирролидинил, замещенный по атому азота R^5 .

В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой метил, этил, трифторэтил или изопропил.

В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой независимо гидроксильную, амино-, или N-метиламино-

В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)-4-((3-феноксифенил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид, или 8-бром-4-((4-(3-фторфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 8-бром-4-((3-фтор-4-феноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет применение индивидуальных стереоизомеров, смеси стереоизомеров, пролекарственных производных, защищенных производных, производных N-оксидов, сольватов или гидридов соединения формулы (I), как определено выше, в качестве ингибитора $Ax1$ для лечения заболевания или состояния, опосредованного $Ax1$. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) включает его стереоизомер.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет применение соединения формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, опосредованного $Ax1$.

Соединения формулы (I), как определено выше, или их фармацевтически приемлемые соли являются полезными для лечения гиперпролиферативных заболеваний, связанных с, сопровождаемых и/или вызванных гиперфункцией $Ax1$, в частности гиперпролиферативных заболеваний, индуцированных рецепторной тирозинкиназой $Ax1$.

Соединения формулы (I), как определено выше, или их фармацевтически приемлемые соли способны ингибировать пролиферацию клеток и, таким образом, подходят для лечения и/или профилактики гиперпролиферативных заболеваний, индуцированных рецепторной тирозинкиназой $Ax1$, особенно выбранных видов рака и метастазов первичной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет

собой несколько типов рака, опосредованных Axl.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, СПИД-ассоциированный рак, СПИД-ассоциированную лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистицитому, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль центральной нервной системы, астроцитому, краниофарингиому, эпендимобластому, эпендимому, медуллобластому, медуллоэпителиому, опухоли паренхимы шишковидной железы промежуточной дифференцировки, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластому, опухоли головного и спинного мозга, рак молочной железы, опухоли бронхов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, рак желудочно-кишечного тракта, лимфому центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хордому, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, хронические миелопролиферативные заболевания, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, кожную Т-клеточную лимфому, фунгоидный микоз, синдром Сезари, рак эндометрия, эпендимобластому, эпендимому, рак пищевода, эстеziонейробластому, семейство опухолей саркомы Юинга, экстракраниальную герминогенно-клеточную опухоль, экстрагонадальную герминогенно-клеточную опухоль, карциному внепеченочных желчных протоков, внутриглазную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, гастроинтестинальную карциноидную опухоль, гастроинтестинальную стромальную опухоль (gist), гастроинтестинальную стромально-клеточную опухоль, экстракраниальную герминогенно-клеточную опухоль, экстрагонадальную герминогенно-клеточную опухоль, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный (печень) рак, гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, внутриглазную меланому, опухоли островков поджелудочной железы (эндокринная часть поджелудочной железы), саркому Капоши, почечно-клеточный рак, рак почки, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, рак гортани, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, лейкоз, рак губы и полости рта, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, СПИД-ассоциированную лимфому, лимфому Беркитта, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистицитому кости и остеосаркому, медуллобластому, медуллоэпителиому, меланому, внутриглазную (глаз) меланому, рак из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи неизвестного происхождения, рак ротовой полости, синдромы множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому, плазмноклеточную опухоль,

миелодиспластический синдром, миелодиспластические/миелопролиферативные новообразования, миелогенный лейкоз, миелоидный лейкоз, миелопролиферативные заболевания, рак носовой полости и придаточных пазух, рак носоглотки, нейробластома, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак ротовой полости, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности, рак поджелудочной железы, папилломатоз, рак парашитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, пинеобластома и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, плевроролечную бластома, беременность и рак молочной железы, рак простаты, рак прямой кишки, почечно-клеточный (почка) рак, переходно-клеточный рак, рак дыхательных путей, ретинобластома, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому, саркому Юинга, саркому Капоши, саркому матки, немеланомный рак кожи, меланомный рак кожи, карциному кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркома мягких тканей, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак шеи, рак желудка (желудочно-кишечного тракта), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, Т-клеточную лимфому, рак яичек, рак горла, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластическую опухоль, гестационный рак, рак мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточный рак, рак уретры, рак матки, рак эндометрия, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема, или опухоль Вильмса.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, включающую соединение формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемую соль, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, для лечения заболевания или состояния, опосредованного Ax1.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит индивидуальные стереоизомеры, смесь стереоизомеров, пролекарственные производные, защищенные производные, производные N-оксида, сольваты или гидриды соединения формулы (I), как определено выше.

Фармацевтически приемлемые солевые формы включают фармацевтически приемлемые кислотнo/анионные или основнo/катионные соли. Фармацевтически приемлемые кислотнo/анионные соли включают ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, камсилат, карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдисилат, эстолат, эзилат, фумарат, глицептат, глюконат, глутамат, гликоллиларсанлат, гексилрезорцинат, гидробромид, гидрохлорид,

гидроксинафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, малонат, манделат, мезилат, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, памоат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, гидросульфат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат и триэтиодидные соли. Фармацевтически приемлемые основно/катионные соли включают соли натрия, калия, кальция, магния, диэтанолamina, N-метил-D-глюкамина, L-лизина, L-аргинина, аммония, этаноламина, пиперазина и триэтанолamina.

Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты образуется взаимодействием формы свободного основания соединения формулы (I) с подходящей неорганической или органической кислотой, включая, но не ограничиваясь ими, бромистоводородную, хлористоводородную, серную, азотную, фосфорную, янтарную, малеиновую, муравьиную, уксусную, пропионовую, фумаровую, лимонную, винную, молочную, бензойную, салициловую, глутаминовую, аспарагиновую, п-толуолсульфоновую, бензолсульфоновую, метансульфоновую, этансульфоновую, нафталинсульфоновую (например, 2-нафталинсульфоновая кислота) или гексановую кислоту.

Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты соединения формулы (I) может включать или представлять собой, например, гидробромид, гидрохлорид, сульфат, нитрат, фосфат, сукцинат, малеат, формиат, ацетат, пропионат, фумарат, цитрат, тартрат, лактат, бензоат, салицилат, глутамат, аспартат, п-толуолсульфонат, бензолсульфонат, метансульфонат, этансульфонат, нафталинсульфонат (например, 2-нафталинсульфонат) или гексаноат.

Формы свободной кислоты или свободного основания соединений формулы (I) могут быть получены из соответствующей соли присоединения основания или соли присоединения кислоты, соответственно. Например, соединение формулы (I) в форме соли присоединения кислоты может быть преобразовано в соответствующее свободное основание путем обработки подходящим основанием (например, раствором гидроксида аммония, гидроксидом натрия и т.п.). Соединение формулы (I) в форме соли присоединения основания может быть преобразовано в соответствующую свободную кислоту обработкой подходящей кислотой (например, хлористоводородной кислотой и т.п.).

Пролекарственные производные соединений формулы (I) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области (например, для получения дополнительных сведений см. Saulnier et al., (1994), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, 1985; полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Защищенные производные соединений формулы (I) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. Подробное описание методов, применимых для создания защитных групп и их удаления, можно найти в T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Chemistry," 3rd edition, John Wiley and Sons, Inc., 1999,

полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Соединения формулы (I) могут быть получены в виде индивидуальных стереоизомеров путем взаимодействия рацемической смеси соединения с оптически активным разделяющим агентом с образованием пары диастереоизомерных соединений, разделением диастереомеров и выделением оптически чистых энантиомеров. Разделение энантиомеров можно проводить с использованием ковалентных диастереомерных производных соединений формулы (I) или с использованием диссоциируемых комплексов (например, кристаллических диастереомерных солей). Диастереомеры имеют различные физические свойства (например, точки плавления, точки кипения, растворимость, реакционную способность и т.п.) и могут быть легко разделены, используя преимущества этих различий. Диастереомеры могут быть разделены хроматографией или методами разделения/расщепления на основе различий в растворимости. Затем оптически чистый энантиомер извлекают вместе с разделяющим агентом любыми практическими способами, которые не приводят к рацемизации. Более подробное описание методов, применимых для разделения стереоизомеров соединений из их рацемической смеси, можно найти в Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions," John Wiley And Sons, Inc., 1981, полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Фармацевтическая композиция сформулирована в виде таблеток, пилюль, капсул, жидкости, лекарственной формы для ингаляции, раствора для назального спрея, суппозитория, раствора, геля, эмульсии, мази, глазных капель или ушных капель.

Подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители, адъювант или эксципиенты для применения в фармацевтических композициях по изобретению включают таблетки (таблетки с покрытием), полученные, например, из коллидона или шеллака, гуммиарабика, талька, диоксида титана или сахара, капсулы (желатин), растворы (водный или водно-этанольный раствор), сиропы, содержащие активные вещества, эмульсии или порошки для ингаляции (различных сахаридов, таких как лактоза или глюкоза, соли и смеси этих эксципиентов друг с другом) и аэрозоли (содержащие пропеллент или свободные ингаляционные растворы).

Эксципиенты, которые можно использовать, включают, например, воду, фармацевтически приемлемые органические растворители, такие как парафины (например, нефтяные фракции), растительные масла (например, арахисовое или кунжутное масло), моно- или полифункциональные спирты (например, этанол или глицерин), носители, такие как природные минеральные порошки (например, каолин, глины, тальк, мел), синтетические минеральные порошки (например, высокодисперсная кремниевая кислота и силикаты), сахара (например, тростниковый сахар, лактоза и глюкоза), эмульгаторы (например, лигнин, отработанные сульфитные растворы, метилцеллюлоза, крахмал и поливинилпирролидон) и смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, стеариновая кислота и лаурилсульфат натрия).

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способ лечения

заболевания или состояния, опосредованного Ax1, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способ ингибирования рецепторной тирозинкиназы Ax1 или ингибирования роста раковых клеток.

Кроме того, соединение вводят отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, такими как иммунотерапия (анти-PD-1 и/или анти-CTLA4), химиотерапия и облучение.

В некоторых вариантах осуществления, соединение вводят отдельно или в комбинации с одним или более блокаторами иммунных контрольных точек (анти-PD-1, анти-PDL, анти-CTLA4) и дополнительными химиотерапевтическими средствами

Способы введения таких соединений и композиций включают, но не ограничиваются ими, внутривенное введение, ингаляцию, пероральное введение, ректальное введение, парентеральное, интравитреальное введение, подкожное введение, внутримышечное введение, интраназальное введение, наружное применение, местное введение, офтальмологическое введение, буккальное введение, введение в трахею, бронхиальное введение, сублингвальное введение или введение через уши. Соединения, предоставленные в настоящем документе, вводят в виде известных фармацевтических лекарственных форм, включая таблетки, капсулы или эликсиры для перорального введения, суппозитории для ректального введения, стерильные растворы или суспензии для парентерального или внутримышечного введения, лосьоны, гели, мази или кремы для местного применения, и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления, соединение вводят посредством внутривенного введения, подкожного введения, ингаляции, перорального введения, ректального введения, парентерального введения, интравитреального введения, внутримышечного введения, интраназального введения, наружного применения, местного введения, глазного введения, офтальмологического введения, трансбуккального введения, трахеального введения, бронхиального введения, или сублингвального введения.

В вышеуказанных способах соединение формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемая соль вводят в систему, содержащую клетки или ткани. В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы (I), как определено выше, или его фармацевтически приемлемую соль вводят человеку или животному.

Терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости, среди прочего, от указанного заболевания, серьезности заболевания, возраста и относительного состояния здоровья субъекта, эффективности вводимого соединения, способа введения и желаемого лечения.

Требуемая дозировка также будет варьироваться в зависимости от способа введения, конкретного состояния, которое необходимо лечить, и желаемого эффекта.

Соединение формулы (I), как определено выше, получают путем:

(a) необязательного преобразования соединения формулы (I) в фармацевтически

приемлемую соль;

(b) необязательного преобразования солевой формы соединения формулы (I) в несолевую форму;

(c) необязательного преобразования неокисленной формы соединения формулы (I) в фармацевтически приемлемый N-оксид;

(d) необязательного разделения индивидуального изомера соединения формулы (I) из смеси изомеров;

(e) необязательного преобразования недериватизированного соединения формулы (I) в фармацевтически приемлемое пролекарственное производное; и

(f) необязательного преобразования пролекарственного производного соединения формулы (I) в его недериватизированную форму.

Принципы изобретения

Далее настоящее изобретение будет подробно описано со ссылкой на примеры. Однако следующие примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения. Специалистам должно быть ясно, что изменения и модификации могут быть сделаны без изменения объема изобретения.

Метод жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС):

1. Образцы обрабатывали на системе Agilent Technologies 6120 MSD с колонкой с обращенной фазой Zorbax Eclipse XDB-C18 (3,5 мкм) (4,6×50 мм) при комнатной температуре со скоростью потока 1,5 мл/минут.

2. В подвижной фазе использовали растворитель А (вода/0,1% муравьиная кислота) и растворитель В (ацетонитрил/0,1% муравьиная кислота): 95%/5% - 0%/100% (А/В) в течение 5 минут.

3. Масс-спектры (m/z) регистрировали с использованием электрораспылительной ионизации (ESI).

4. Данные ионизации округляли до ближайшего целого числа.

Получение соединений формулы (I) или их фармацевтически приемлемых солей, как определено выше, описано в примере и таблице 1 публикации РСТ No. WO 2013/142382, которая была подана 15 марта 2013 г., а также в эквивалентных заявках и патентах во многих других странах, например в патенте США No. 8877763, патенте Австралии No. 2013235344, патенте Японии No. 6101341 и патенте Китая No. 104428298. Содержание всех патентов, опубликованных заявок и ссылок, цитируемых в настоящем документе, включено в настоящий документ посредством ссылки в их полном объеме.

Некоторые соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли называются следующим образом:

221. 4-((4-(бензилокси)фенил)амино)-8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;

222. 8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)-4-((4-феноксифенил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;

223. 8-бром-4-((4-(циклопентилокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-

- ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
224. 8-бром-4-((4-(циклогексилметокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
225. 8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)-4-((4-(п-толилокси)фенил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
226. 8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)-4-((4-феноксифенил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
227. 8-бром-4-((4-(циклопентилметокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
228. 8-бром-4-((4-(циклогексилокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
229. 8-хлор-4-((4-(циклогексилокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
230. 8-бром-4-((4-(4-изопропилфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
231. 8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)-4-((4-(п-толилокси)фенил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
232. 8-бром-4-((4-(4-фторфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
233. 8-бром-4-((4-(циклогексилокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
234. 4-((4-(бензилокси)фенил)амино)-8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
235. 8-бром-4-((4-(циклопентилметокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
236. 8-бром-4-((4-(4-изопропилфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
237. 8-бром-4-((4-(циклопентилокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
238. 8-бром-4-((4-(3-фторфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
239. 8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)-4-((4-(о-толилокси)фенил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
240. 8-бром-4-((4-(3-фторфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;
241. 8-бром-4-((4-(3,4-дифторфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
242. 8-бром-4-((4-(4-хлорфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;
243. 8-бром-4-((4-(3,5-дифторфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-

ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;

244. 8-бром-4-((4-(3-фторфенокси)-3-метилфенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;

245. 8-бром-4-((3-фтор-4-феноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;

246. 8-бром-4-((3-метил-4-феноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;

247. 8-бром-4-((3-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид;

248. 8-бром-2-(1-изопропилпиперидин-4-иламино)-4-(4-феноксифениламино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он;

249. 8-бром-2-(1-этилпиперидин-4-иламино)-4-(4-феноксифениламино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он; и

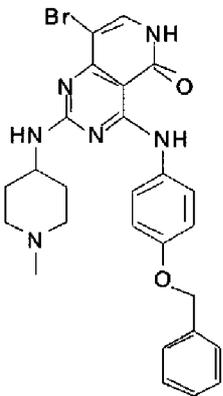
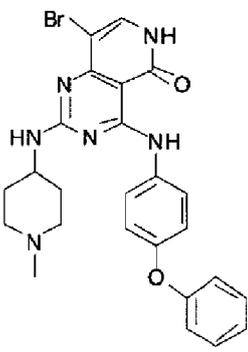
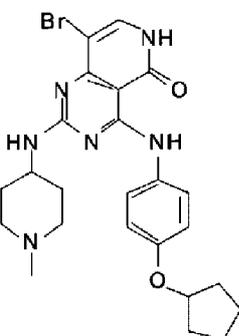
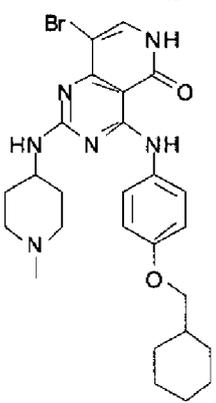
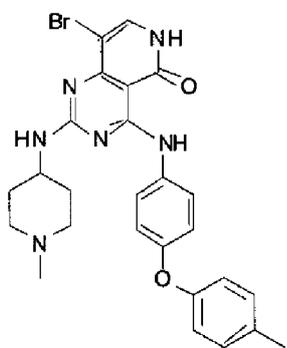
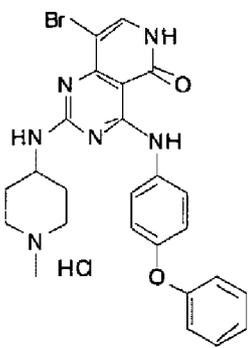
250. 8-бром-4-(4-феноксифениламино)-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-иламино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он.

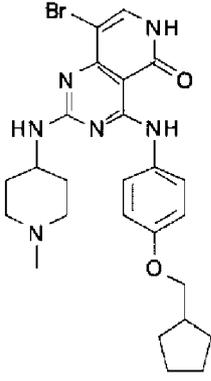
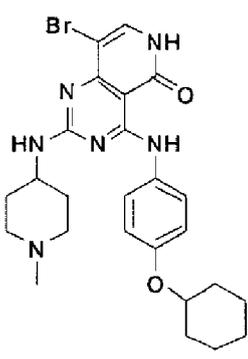
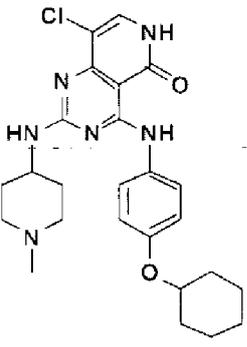
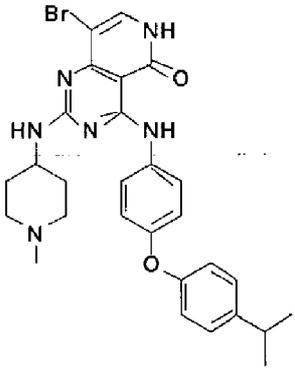
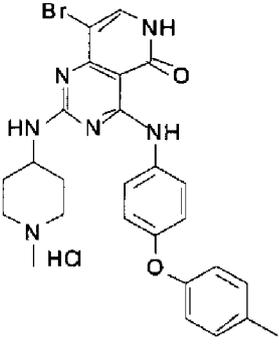
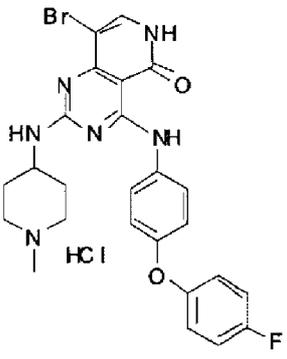
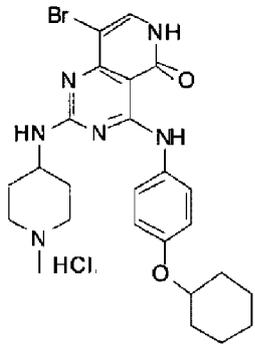
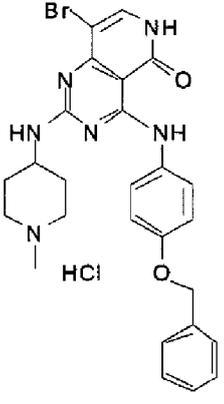
В таблице 1 показаны структуры соединений формулы (I).

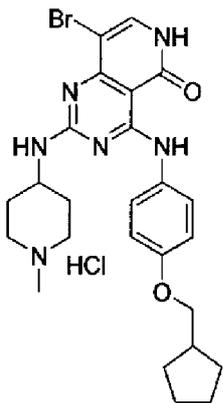
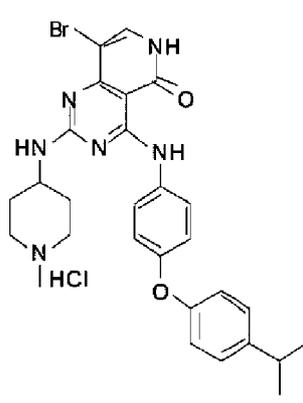
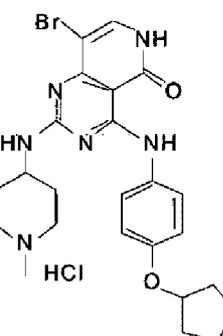
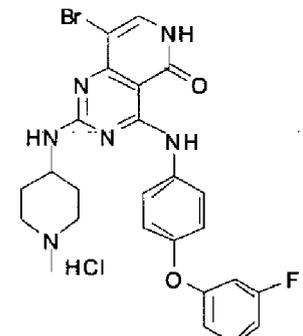
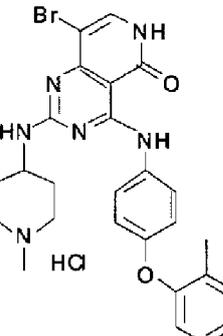
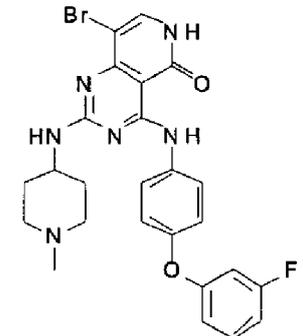
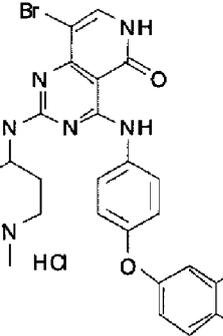
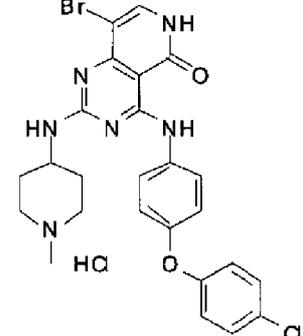
Все данные указаны в диапазоне значений IC₅₀ (Ax1).

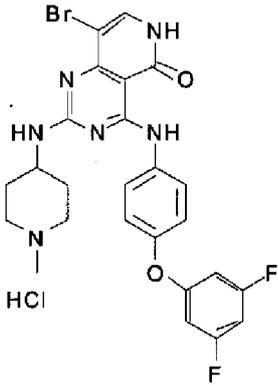
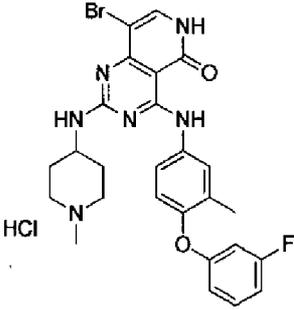
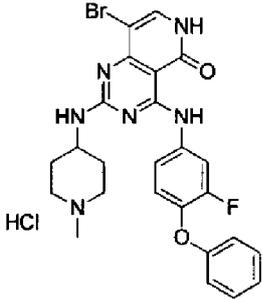
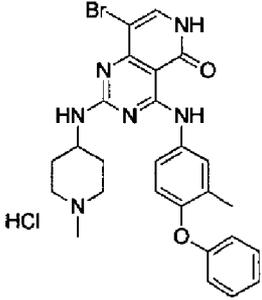
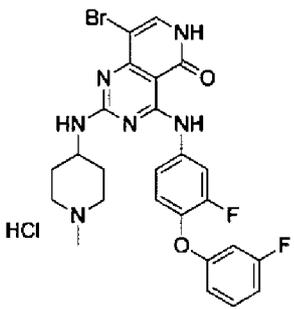
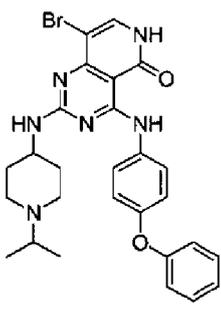
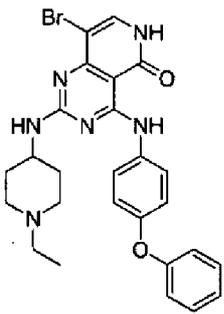
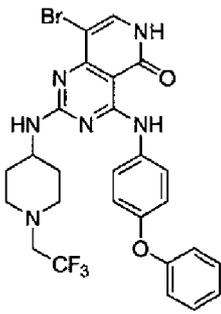
Каждый +++, ++ и + обозначает 1-10 нМ, 11-100 нМ, 101-1000 нМ, 1001-10000 нМ, соответственно.

[Таблица 1]

No	Структура	MS (ESI+) m/z	Ax1 (IC ₅₀)	No	Структура	MS (ESI+) m/z	Ax1 (IC ₅₀)
221		535	++	222		521	+++
223		513	++	224		541	++
225		535	+++	226		521	+++

227		527	++	228		527	++
229		483	++	230		563	+++
231		535	+++	232		539	+++
233		527	++	234		535	++

235		527	++	236		563	+++
237		513	++	238		539	+++
239		535	+++	240		539	+++
241		557	+++	242		555	+++

243		557	+++	244		553	+++
245		539	+++	246		535	+++
247		557	+++	248		549	+++
249		535	+++	250		589	++

Содержание всех патентов, патентных заявок и публикаций, перечисленных в настоящем документе, включено в настоящий документ посредством ссылки.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ

1. Анализ ингибирования киназы (ингибирование ферментативной активности киназы Ax1)

Соединения формулы (I), полученные выше, были проанализированы для измерения их способности ингибировать Ax1 киназу. Ax1 принадлежит к недавно идентифицированному семейству рецепторных тирозинкиназ (RTK) TYRO-3, Ax1,

MERTK (TAM). Специфичный для остановки роста белок 6 (GAS6) служит общим лигандом для каждой TAM-киназы и проявляет самое высокое сродство к Ax1. После связывания GAS6 Ax1 гомодимеризуется и впоследствии индуцирует несколько нисходящих сигнальных путей, участвующих в пролиферации, миграции, инвазии, антиапоптозе, ангиогенезе, метастазировании и терапевтической устойчивости. Повышенная регуляция Ax1 была зарегистрирована в широком спектре линий раковых клеток, а также в образцах рака у пациентов с раком молочной железы, острым лейкозом, колоректальным раком, раком легкого, меланомой, раком яичников, или раком простаты, среди прочего.

Способы

Соединения формулы (I), полученные выше, первоначально разбавляли до 10 мМ в 100% DMSO (CALBIOCHEM™) для хранения и превращали в буферный раствор киназы для создания концентрации соединения в диапазоне от 1 мкМ до 10 мкМ. Серийные разведения соединений разливали в 96-луночный планшет (GREINER BIOSCIENCES™) по 6 мкл каждый. Усеченную Ax1 человека (CARNA BIOSCIENCES™) разбавляли в киназном буфере и добавляли к растворам соединений и предварительно инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем, ATP (TEKNOVA™) и раствор субстрата (предлагаемые субстраты производства PerkinElmer™, например, пептид Ulight™-TK peptide) для Ax1 (PerkinElmer™) добавляли (12 мкл каждый) в лунки, содержащие раствор соединения и фермент. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа. После инкубации для остановки фосфорилирования добавляли стоп-раствор с EDTA, водой и детекторным буфером (PerkinElmer™) (12 мкл каждый). После добавления стоп-раствора и 5 минут встряхивания добавляли раствор для обнаружения, содержащий антитело, меченное европием (предлагаемые субстраты производства PerkinElmer™, например, PT66 для Ax1), воду и детекторный буфер Lance (12 мкл) в реакционную смесь и снова инкубировали в течение 50 минут. Фосфорилирование субстрата зависело от эмиссии 665 нм, измеренной после добавления раствора для обнаружения и 50 минут инкубации.

Результаты

Соединения Формулы (I) проявляли полезные фармакологические свойства. Используемый в настоящем описании способ эффективности ингибирующей активности (нМ) представляет собой диапазон ингибирующей активности при 50% (IC₅₀), как показано в таблице 2. Для оценки ингибирующей активности соединений Формулы (I) в отношении Ax1 использовали эталонные соединения ASP2215 (гилтеритиниб, Astellas), R428 (BGB324, VerGenBio) и стауроспорин (ингибитор панкиназы).

Например, соединение 238 формулы (I), а именно, 8-бром-4-((4-(3-фторфенокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид, показало сильное ингибирование киназной активности Ax1. Его эффективность в биохимическом анализе сопоставима с эффективностью клинически разрабатываемых ингибиторов, APS2215 и R428. В таблице 2 показан диапазон значений

IC₅₀ Ax1 для типичных соединений формулы (I). Как показано в таблице 2, эталонное соединение, стауроспорин, является наиболее эффективным, тогда как соединения формулы (I), полученные выше, демонстрируют лучшую селективность, чем эталонное соединение, и проявляют активность, аналогичную ASP2215 и R428. Кроме того, соединения формулы (I) также демонстрируют лучшую селективность, чем соединения, указанные звездочкой и описанные в предшествующем уровне техники в WO 2011/053861 и PCT/US2010/054853. Взятые вместе, эти данные показывают, что соединения формулы (I) значительно улучшают селективность, а также ингибирующую способность в Ax1 по сравнению с известными ингибиторами Ax1, ASP2215 и R428.

Соединения No. 8 и 136, описанные в WO 2011/053861, показали множественную ингибирующую активность против различных тестируемых киназ, включая JAK2. В частности, они не показали воздействия лекарств на крыс после перорального введения 10 мг/кг, что свидетельствует о том, что они не всасываются в кишечнике или очень быстро выводятся из организма.

В таблице 2 показано биохимическое ингибирование Ax1 и JAK2 типичными соединениями формулы (I).

[Таблица 2]

Соединение	Ax1	JAK2	Соединение	Ax1	JAK2
ASP2215	+++	+++	223	++	++
R428	+++	++	225	+++	+
*8	+++	+++	226	+++	++
*136	+++	++++	228	++	++
*203	+++	++	233	++	++
222	+++	++	240	+++	++
241	+++	+	238	+++	++
			стауроспорин	++++	++++

* Соединения 8, 136 и 203 описаны в WO 2011/053861 и PCT/US2010/054853.

Все данные указаны в диапазоне значений IC₅₀. Каждое +, ++, +++ и ++++ обозначало 1-10 нМ, 11-100 нМ, 101-1000 нМ, 1001-10000 нМ, соответственно.

2. Анализ жизнеспособности клеток: ингибирование пролиферации Ax1-положительных клеток

Соединения формулы (I), полученные выше, тестировали на их действие на ингибирование пролиферации клеточных линий трижды негативного рака молочной железы, экспрессирующих Ax1 (MDA-MB-231 и Hs578T), и Ax1 отрицательных клеточных линий рака молочной железы (MCF7). Ax1 является членом семейства рецепторных тирозинкиназ TAM (TYRO3-Ax1-MER), которые при активации могут увеличивать выживаемость, пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток, ангиогенез и взаимодействия опухоль-хозяин. После связывания GAS6 с Ax1, Ax1 впоследствии

активирует последующие сигнальные пути, такие как фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), саркома RAt (RAS) и киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (ERK).

Сверхэкспрессия или aberrантная активация Ax1 была описана при множественных злокачественных новообразованиях эпителиального и гематологического происхождения и часто связана с плохим прогнозом, увеличением частоты рецидивов, снижением безрецидивной выживаемости и плохой общей выживаемостью. Более того, экспрессия Ax1 связана с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT), частым признаком метастатических опухолей, часто коррелирующим с лекарственной устойчивостью. Следовательно, Ax1 является привлекательной молекулярной мишенью для множественных солидных опухолей, включая рак молочной железы.

Способы

Соединения формулы (I), полученные выше, тестировали на жизнеспособность клеток на клетках MDA-MB-231 и Hs578T. Для анализа жизнеспособности клеток клетки MDA-MB-231 и Hs578T, экспрессирующие Ax1 человека, были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA). Эта клеточная линия поддерживалась в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (HyClone®), содержащей 10% бычьей телячьей сыворотки (BCS; HyClone™), дополненной железом. Клетки высевали по 2×10^4 клеток в 96-луночные культуральные планшеты, а затем добавляли серийно разведенные соединения. После 72 часов инкубационного периода при 37°C жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа ATPLite 1step (Perkin-Elmer®), который основан на количественном определении АТФ из жизнеспособных клеток. Концентрации для 50% максимального ингибирования пролиферации клеток (значения GI₅₀) были рассчитаны с использованием нелинейной регрессии и определены как концентрация, необходимая для 50% снижения люминесценции или поглощения обработанных по сравнению с необработанными контрольными клетками (Prism™ Software).

Результаты

Данные ингибирования GI₅₀ типичных соединений формулы (I) показаны в таблице 3. Соединения формулы (I) проявляли ингибирование пролиферации клеток со значением GI₅₀ менее 3 мкМ. В частности, соединение 237, 8-бром-4-((4-(циклопентилокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид, проявляет уровень ингибирования, превышающий уровни, продемонстрированные эталонными ASP2215 и R428 в Ax1-экспрессирующих линиях клеток рака молочной железы. Такая сильная противоопухолевая активность предполагает, что соединения формулы (I) имеют лучшее терапевтическое значение, чем эталон и соединение 203, указанное звездочками, описанное в предшествующем уровне техники (заявка РСТ No. РСТ/US2010/054853).

В таблице 3 показана жизнеспособность клеток Ax1-положительной линии раковых клеток с использованием репрезентативных соединений формулы (I).

[Таблица 3]

Соединение	MDA-MB-231 (GI ₅₀)	Hs578T (GI ₅₀)	Соединение	MDA-MB- 231 (GI ₅₀)	Hs578T (GI ₅₀)
ASP2215	++	++	222	++	++
R428	+	++	226	++	++
*203	+++	+++	228	++	++
228	+++	+++	235	+++	+++
233	++	+++	238	+++	+++
237	+++	++++	241	++	++
			240	++	++

* Соединение 203 описано в WO 2011/053861 и PCT/US2010/054853.

Все данные указаны в диапазоне значений GI₅₀. Каждое +, ++, +++ и ++++ обозначало 0,1-1,0 мкМ, 1,1-3,0 мкМ, 3,1-10 мкМ, 11-30 мкМ, соответственно.

3. Анализ миграции и инвазии: ингибирование метастатического потенциала

Для того чтобы проверить, показывают ли соединения формулы (I) эффект на ингибирование метастазирования, клеточное миграционное и инвазивное поведение анализировали с использованием анализа трансвелл и инвазии матригеля в клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231.

Способы

Соединения формулы (I), полученные выше, тестировали в анализах миграции и инвазии с использованием линии клеток рака молочной железы MDA-MB-231. Миграцию клеток осуществляли с помощью анализа трансвелл (BD Biosciences, CA, USA). Вкратце, 5×10^4 клеток в бессывороточном RPMI-1640 высевали на мембрану (размер пор 8,0 мкм), вставленную в лунки 24-луночного планшета. RPMI-1640, содержащий 10% FBS, добавляли в нижнюю камеру каждой лунки. Через 24 часа клетки в верхней камере удаляли ватным тампоном, и клетки, достигшие нижней стороны мембраны, фиксировали и окрашивали кристаллическим фиолетовым (1% в метиловом спирте) в течение 10 минут. Ячейки, расположенные на нижней стороне фильтра (5 полей/фильтр), подсчитывали. Анализ клеточной инвазии проводили аналогично, за исключением того, что матригель (BD Biosciences, CA, USA) добавляли в каждую лунку за 6 часов до посева клеток на мембрану. Через 48 ч матригель и все оставшиеся клетки в верхней камере удаляли ватными тампонами. Клетки на нижней поверхности мембраны фиксировали и окрашивали, как описано выше. Соединение 238 и эталонное соединение, R428, инкубировали, как показано на фиг. 1a - 1c. Данные представляют результаты трех независимых областей окрашенной мембраны.

Результаты

Как показано на фиг. 1a-1c, репрезентативное соединение 238 формулы (I) демонстрирует нарушенные миграционные и инвазивные способности клеток MDA-MB-231, что превосходит эталонное соединение, R428. Интересно, что репрезентативное

соединение 238 формулы (I) значительно ингибировало миграцию и инвазию даже при 0,03 мкМ по сравнению с R428. Эти результаты показывают, что репрезентативное соединение обладает очень мощной антиметастатической активностью с использованием клеток MDA-MB-231. Кроме того, соединение формулы (I), полученное выше, может предоставить возможный метод лечения метастазов, связанных с экспрессией Ax1, таких как агрессивная при раке груди.

4. Противоопухолевая активность на сингенных моделях рака молочной железы 4T1 in vivo

Чтобы проверить, проявляют ли соединения формулы (I) противоопухолевую активность на сингенных моделях рака молочной железы 4T1 in vivo, их тестировали следующим образом.

Способы

Соединения формулы (I), полученные выше, тестировали на сингенной модели с использованием раковых клеток молочной железы 4T1 мыши. Клетки 4T1 выращивали в среде RPMI1640 (Sigma, Cat # R6504), дополненной 10% FBS (Invitrogen, Cat # 10438-026), и 1% пенициллина стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Cat # 15140-122). Клетки собирали трипсинизацией, когда они достигли 70-80% конfluence. За день до инокуляции клеток с правого бока мышью BALB/C удалили мех с помощью триммера для волос. На следующий день участок кожи вокруг места укола дезинфицировали мягким тампоном с хирургическим спиртом. Для создания аллотрансплантатов клетки суспендировали в бессывороточной среде и смешивали 1:1 с матригелем для получения 1×10^6 клеток /100 мкл. Клетки, суспендированные в матригеле, имплантировали подкожно с помощью 1 мл шприца BD, присоединенного к игле 24 размера (иглы BD Precision Glide, 0,55 мм x 25 мм, REF # 302805). Мышей рандомизировали на основе объема опухоли, и шесть мышей были распределены на группу. Опухолевые трансплантаты измеряли примерно через 5 дней после инокуляции клеток, когда они стали пальпироваться. Животным перорально вводили контрольный носитель или соединение 238 (один раз в день, 30 мг/кг/день) один раз в день в течение 14 дней. Носитель для перорального введения состоит из 10% сульфобутилового эфира β -циклодекстрина натрия (SBECD) в 50 мМ цитратном буфере (pH 3,0). Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали следующим образом: $\%TGI = [1 - (\text{обработка } TV_{\text{конечный}} - \text{обработка } TV_{\text{начальный}}) / (\text{контроль } TV_{\text{конечный}} - \text{контроль } TV_{\text{начальный}})] * 100$

Результаты

Целью данного исследования было проверить противоопухолевую эффективность соединения 238 отдельно взятого в сингенной модели опухоли молочной железы 4T1. Все виды лечения хорошо переносились, поскольку не было никаких клинических признаков патологии и значительных изменений массы тела животного по сравнению с контролем-носителем. На 15 день средний объем опухоли в группе лечения # 2 (соединение 238) составлял $669 \pm 60 \text{ мм}^3$, что приводило к ингибированию роста опухоли (TGI) на 59% (см. фиг. 2а). В целом, эти результаты предполагают, что соединение 238 демонстрирует

хорошую противоопухолевую активность в иммунокомпетентной сингенной модели опухоли 4T1 у мышей BALB/C.

Интересно, что у мышей с иммунодефицитом отсутствует противоопухолевый эффект 30 мг/кг/день соединения 238 (см. фиг. 2b), что указывает на то, что оно может подавлять рост опухоли за счет прямого усиления иммунного ответа.

5. Антиметастатическая активность в сингенных моделях рака груди 4T1 in vivo

Для того, чтобы проверить, проявляют ли соединения формулы (I) противораковую метастатическую активность в моделях метастазирования легкого B16F10 и брюшины СТ-26, они были протестированы следующим образом.

Способы

Соединения формулы (I), полученные выше, тестировали на моделях метастазов с использованием клеток меланомы B16F10 мыши и СТ26-люцифераза рака толстой кишки. Обе клетки выращивали в среде RPMI1640 (Sigma, Cat # R6504), дополненной 10% FBS (Invitrogen, Cat # 10438-026) и 1% пенициллин стрептомицином (Thermo Fisher Scientific, Cat # 15140-122). Клеточную линию собирали трипсинизацией, когда они достигли 70-80% конфлюэнтности. За день до инокуляции клеток мышей C57BL/6 содержали в условиях, свободных от патогенов, в соответствии с рекомендациями SPF (комнатная температура, влажность 40-60%) и размещали в ABMRC при Yonsei University. Для установления метастазов клетки B16F10 (1×10^6 клеток/мышь, n=3/группа) суспендировали в бессывороточной среде и внутривенно вводили в хвостовую вену с помощью шприца BD 1 мл, прикрепленного к игле 24 размера (иглы BD Precision Glide, 0,55 мм x 25 мм, REF # 302805). Клетки СТ-26-люциферазы (1×10^4 клеток/мышь, n=5/группа) прививали во внутрибрюшинную полость после 24-часовой предварительной обработки 30 мг/кг/день соединением 226.

Мышей рандомизировали, и три мыши для модели B16F10 и пять мышей для модели перитонеальных метастазов СТ26 были распределены на группу. Метастазирование в легкие измеряли через 14 дней после инокуляции клеток. Животным перорально вводили контрольный носитель или соединение 226 (30 мг/кг/день) один раз в день в течение указанных дней. Носитель для перорального введения состоит из 10% сульфобутилового эфира β -циклодекстрина натрия (SBECD) в 50 mM цитратном буфере (pH 3,0). На протяжении всего исследования животных ежедневно контролировали на предмет смертности и клинических признаков (таких как болезнь и изменения поведения). В модели B16F10 после умерщвления мышей органы фиксировали 10% раствором формалина в течение 1 дня. Блок FFPE нарезали на предметные стекла толщиной 4 мкм для нанесения окрашивания H&E. Затем подсчитывали количество опухолевых узлов. Метастазирование СТ26 определяли путем измерения интенсивности люминесценции в брюшной полости.

Результаты

Цель этого исследования заключалась в оценке профилактического эффекта соединения 226 на моделях B16F10 легкого и СТ-26 перитонеальных метастазов.

Обработка соединением 226 хорошо переносилась, поскольку не было клинических признаков отклонения от нормы по сравнению с контролем носителем. На 9 день две мыши в группе носителя были найдены мертвыми в модели метастазирования СТ26. В модели метастазирования В16F10 пероральное введение 30 мг/кг/день соединения 226 резко ингибировало метастазирование в легкие во всех крупных образцах легких, показанных черными участками, и не было опухолевых узлов (см. Фиг. 3а-3с). В моделях перитонеальных метастазов СТ-26 обработка соединением 226 резко снизила интенсивность люминесценции в брюшной полости. Кроме того, мыши в группе носителя начали умирать с 9 дня после приживления клеток СТ26-люциферазы, тогда как мыши, получавшие соединение 226 (1 р/день, 30 мг/кг/день), были живы в течение периода лечения (см. фиг. 4а и 4б). Следовательно, эти результаты предполагают, что соединение 226 формулы (I) может иметь терапевтический потенциал для предотвращения метастазирования у Ax1-положительных онкологических пациентов.

6. Комбинированный эффект с антителом против PD-1 в модели метастазов

Чтобы проверить, проявляют ли соединения формулы (I) комбинированный эффект с мышинным антителом против PD-1 на модели спонтанных метастазов 4T1, их тестировали следующим образом.

Способы

Соединения формулы (I), полученные выше, тестировали на моделях спонтанных метастазов с использованием раковых клеток молочной железы 4T1 мыши. Клетки 4T1 выращивали в среде RPMI1640 (Sigma, Cat # R6504), дополненной 10% FBS (Invitrogen, Cat # 10438-026), и 1% пенициллина стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Cat # 15140-122). Клеточную линию собирали трипсинизацией, когда они достигли 70-80% конфлюэнтности. За день до инокуляции клеток с правого бока мышей BALB/C удалили мех с помощью триммера для волос. На следующий день участок кожи вокруг места укола дезинфицировали мягким тампоном с хирургическим спиртом. Для создания аллотрансплантатов самкам мышей BALB/c (возраст 7 недель) ортотопически имплантировали в молочную железу 5×10^6 сингенных клеток 4T1. Мышей умерщвляли, когда средний объем опухоли достигал 1500 мм^3 .

Мышей рандомизировали по объему опухоли ($\sim 50 \text{ мм}^3$), и по пять мышей были распределены на группу. Опухолевые трансплантаты измеряли примерно через 2 дня после инокуляции клеток, когда они стали пальпироваться. Животным перорально вводили контрольный носитель или соединение 226 формулы (I) (30 мг/кг/день) и/или антитело против PD-1 мыши в течение указанных дней. Носитель для перорального введения состоит из 10% сульфобутилового эфира β -циклодекстрина натрия (SBECD) в 50 мМ цитратном буфере (pH 3,0). На протяжении всего исследования животных ежедневно контролировали на предмет смертности и клинических признаков (таких как болезнь и изменения поведения). После обработки в течение 28 дней всех мышей умерщвляли. Метастаз 4T1 в легкие определяли путем подсчета опухолевых узлов с помощью окрашивания H&E. Твердую опухоль 4T1 на первичном участке измеряли с помощью 3D-

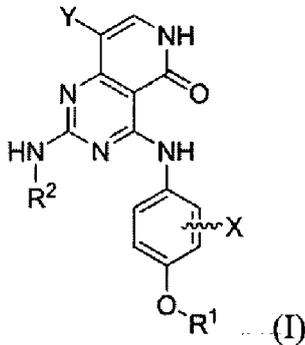
сканера опухолей TM900 (Peria, Belgium). Легкое мышей собирали и фиксировали 10% раствором формалина в течение 24 часов. Блок FFPE реазрезали на предметные стекла толщиной 4 мкм для нанесения окрашивания H&E. Метастатический узел измеряли под микроскопом.

Результаты

Самкам мышей BALB/c (возраст 7 недель) ортотопически имплантировали в молочную железу 5×10^6 сингенных клеток 4T1. Когда опухоли достигли размера примерно 50 мм^3 , мышей лечили носителем, антителом против PD-1 (100 мг два раза в неделю), соединением 226 формулы (I) (30 мг/кг/день) или комбинацией соединения 226 формулы (I) и антитела против PD-1 в течение 4 недель. Мышей умерщвляли на 28 день, и метастазирование в легкие оценивали путем подсчета узлов. Метастазирование в легкие было значительно уменьшено одним соединением 226, а комбинация с антителом против PD1 и соединением 226 увеличивала более сильное уменьшение опухолевых узлов по сравнению с лечением одним соединением 226 (см. фиг. 5a - 5c). Группа, получавшая антитело против PD-1, не продемонстрировала заметной эффективности против метастазов в легких. Соединение 226 значительно подавляло как общую метастатическую нагрузку, так и количество более крупных метастазов (средние+большие метастазы, ≥ 5 мм диаметр; см. фиг. 5c). Что касается роста опухоли на первичном участке, то одно соединение 226 и комбинированные группы продемонстрировали ингибирование роста опухоли, при этом не было разной эффективности между группами, что позволяет предположить, что комбинированный эффект будет действовать на метастатическую опухоль, а не на первичную опухоль (см. фиг. 6). Взятые вместе, эти результаты предполагают, что соединение 226 формулы (I) демонстрирует высокий потенциал для применения в иммуноонкологии при лечении метастазов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли, в качестве ингибитора Ax1 для лечение заболевания или состояния, опосредованного Ax1:



где

R^1 представляет собой C_6 - C_{10} арил, C_6 - C_{10} арил C_1 - C_6 алкил, C_5 - C_6 циклоалкил или C_5 - C_6 циклоалкилметил, необязательно замещенный одним или двумя R^3 ;

R^3 независимо представляет собой фтор, хлор, бром, йод, C_1 - C_6 алкил, или трифторметил;

X представляет собой H, фтор, хлор, бром, йод, метил или трифторэтил;

Y представляет собой хлор, бром, йод, C_1 - C_3 алкил или фенил;

R^2 представляет собой C_3 - C_6 циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где C_3 - C_6 циклоалкил необязательно замещен по атомам углерода одним или двумя R^4 , и где 4-7-членный гетероциклоалкил имеет 1 или 2 гетероатома, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, сульфона или сульфоксида, и необязательно замещен по атому углерода R^4 или по атому азота R^5 ;

R^4 представляет собой независимо гидроксигруппу, гидроксигруппу C_1 - C_6 алкил, амино, аминокгруппу C_1 - C_6 алкил, $-NH(C_1-C_3$ алкил), $-N(C_1-C_3$ алкил) $_2$, C_1 - C_3 алкил или галоген; и

R^5 представляет собой H, C_1 - C_3 алкил или $-C(=O)(C_1-C_3$ алкил), где C_1 - C_3 алкил необязательно замещен 1-3 атомами фтора.

2. Применение по п. 1, где R^1 представляет собой фенил, бензил, циклопентил, циклогексил, циклопентилметил или циклогексилметил, необязательно замещенный одним или двумя R^3 ; и R^3 независимо представляет собой фтор, хлор, бром, йод, C_1 - C_6 алкил или трифторметил.

3. Применение по п. 1, где R^2 представляет собой пиперидинил или пирролидинил, замещенный по атому азота R^5 ; и R^5 представляет собой H, C_1 - C_3 алкил или $-C(=O)(C_1-C_3$ алкил).

4. Применение по п. 1, где R^5 представляет собой метил, этил, трифторэтил или изопропил.

5. Применение по п. 1, где R^3 независимо представляет собой хлор или фтор.

6. Применение по п. 1, где Y представляет собой бром.

7. Применение по п. 1, где X представляет собой фтор или метил.

8. Применение по п. 1, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 8-бром-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)-4-((4-феноксифенил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид.

9. Применение по п. 1, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 8-бром-4-((4-(циклопентилокси)фенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид; или 8-бром-4-((4-(3-фторфеноксифенил)амино)-2-((1-метилпиперидин-4-ил)амино)пиридо[4,3-d]пиримидин-5(6H)-он гидрохлорид.

10. Применение по п. 1, где соединение формулы (I) включает его стереоизомер.

11. Применение соединения формулы (I) по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, опосредованного Ax1.

12. Применение по п.1 или 11, где заболевание или состояние представляет собой несколько типов рака, опосредованных Ax1.

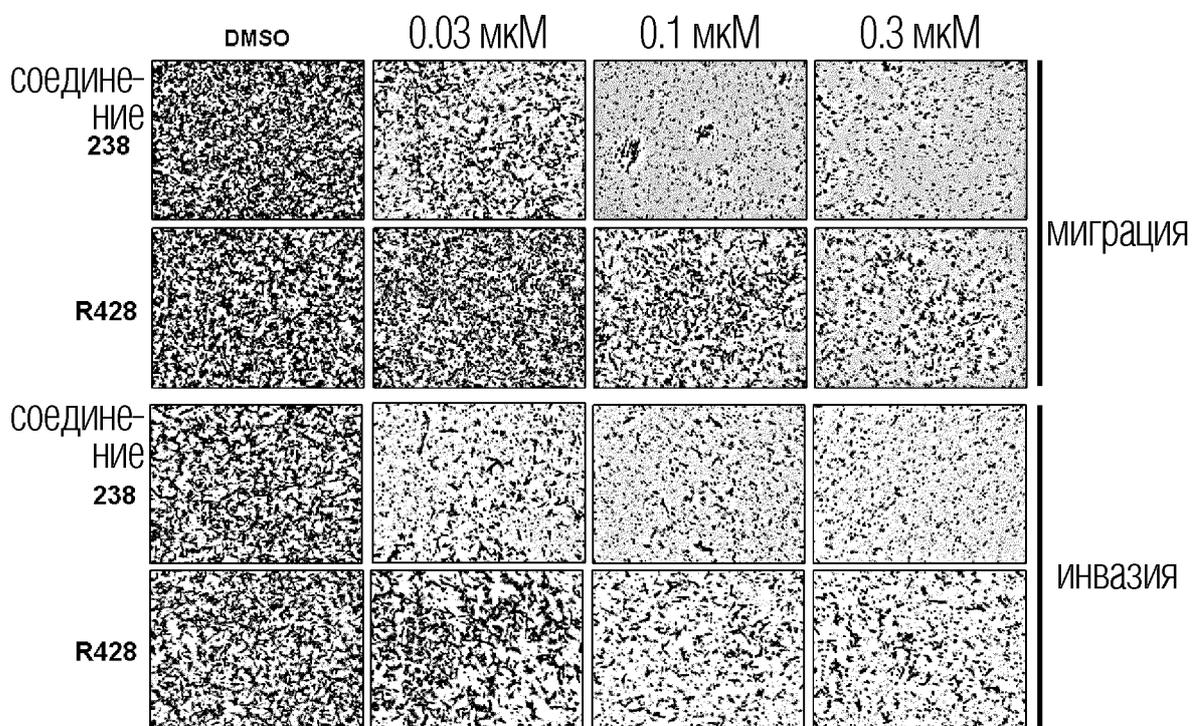
13. Применение по п. 1 или 11, где заболевание или состояние представляет собой острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокортикальную карциному, СПИД-ассоциированный рак, СПИД-ассоциированную лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль центральной нервной системы, астроцитому, краниофарингиому, эпендимобластому, эпендимому, медуллобластому, медуллоэпителиому, опухоли паренхимы шишковидной железы промежуточной дифференцировки, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластому, опухоли головного и спинного мозга, рак молочной железы, опухоли бронхов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, рак желудочно-кишечного тракта, лимфому центральной нервной системы, рак шейки матки, хордому, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, хронические миелолиферативные заболевания, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, кожную T-клеточную лимфому, фунгоидный микоз, синдром Сезари, рак эндометрия, эпендимобластому, эпендимому, рак пищевода, эстеziонейробластому, семейство опухолей саркомы Юинга, экстракраниальную герминогенно-клеточную опухоль, экстрагонадальную герминогенно-клеточную опухоль, карциному внепеченочных желчных протоков, внутриглазную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, гастроинтестинальную карциноидную опухоль, гастроинтестинальную стромальную опухоль, гастроинтестинальную стромально-клеточную опухоль, экстракраниальную герминогенно-клеточную опухоль, экстрагонадальную герминогенно-клеточную опухоль, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак, гистиоцитоз, лимфому

Ходжкина, гипофарингеальный рак, внутриглазную меланому, опухоли островков поджелудочной железы, саркому Капоши, почечно-клеточный рак, рак почки, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, рак гортани, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, лейкоз, рак губы и полости рта, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, СПИД-ассоциированную лимфому, лимфому Беркитта, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости и остеосаркому, медуллобластому, медуллоэпителиому, меланому, внутриглазную меланому, рак из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи неизвестного происхождения, рак ротовой полости, синдромы множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому, плазмоклеточную опухоль, миелодиспластический синдром, миелодиспластические/миелопролиферативные новообразования, миелогенный лейкоз, миелоидный лейкоз, миелопролиферативные заболевания, рак носовой полости и придаточных пазух, рак носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак ротовой полости, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности, рак поджелудочной железы, папилломатоз, рак паращитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, плеврорлегочную бластому, беременность и рак молочной железы, рак простаты, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, переходно-клеточный рак, рак дыхательных путей, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому, саркому Юинга, саркому Капоши, саркому матки, немеланомный рак кожи, меланомный рак кожи, карциному кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак шеи, рак желудка, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, Т-клеточная лимфома, рак яичек, рак горла, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластическую опухоль, гестационный рак, рак мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточный рак, рак уретры, рак матки, рак эндометрия, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема или опухоль Вильмса.

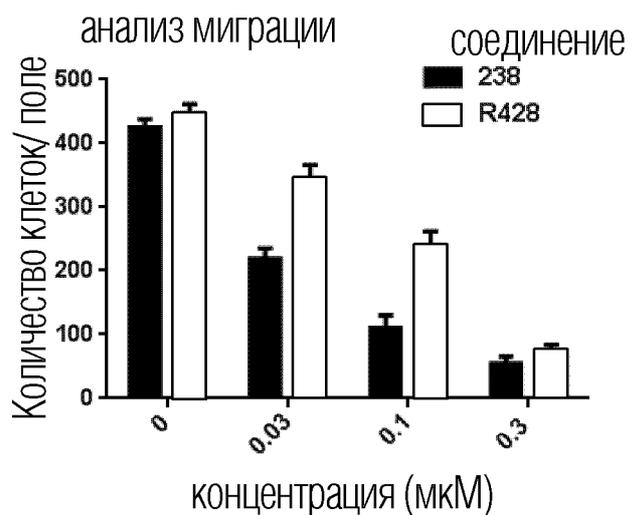
14. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) по любому из п.п. 1-10 или его фармацевтически приемлемую соль, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем, адьювантом или эксципиентом.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) по любому из п.п. 1-10 или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, для лечения заболевания или состояния, опосредованного Ax1.

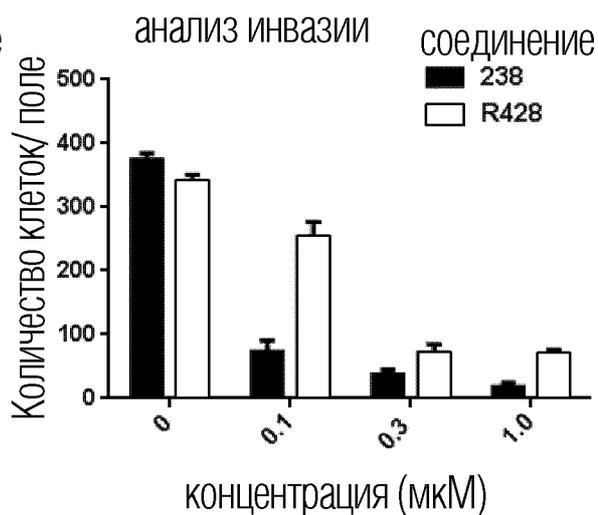
ФИГ. 1а



ФИГ. 1b



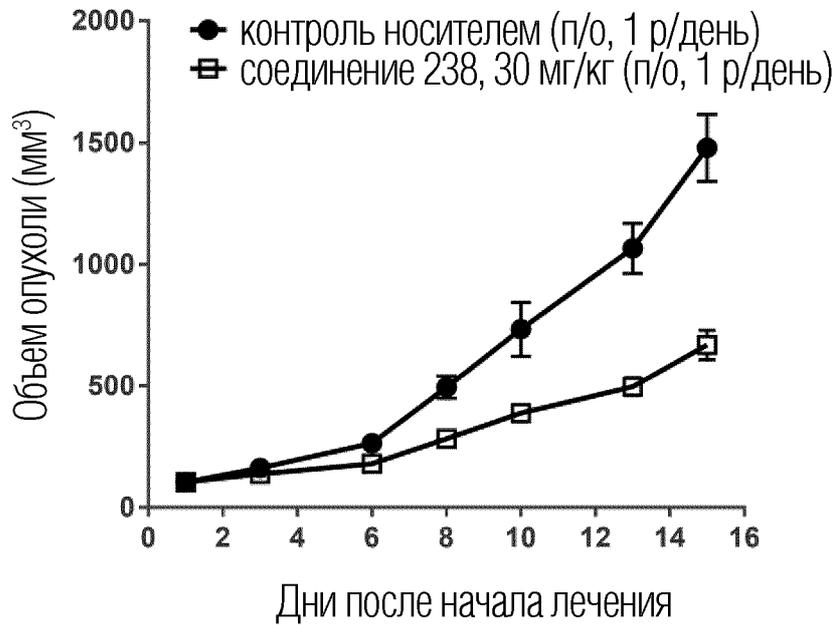
ФИГ. 1с



ФИГ. 2а

Модели опухолей молочной железы 4Т1

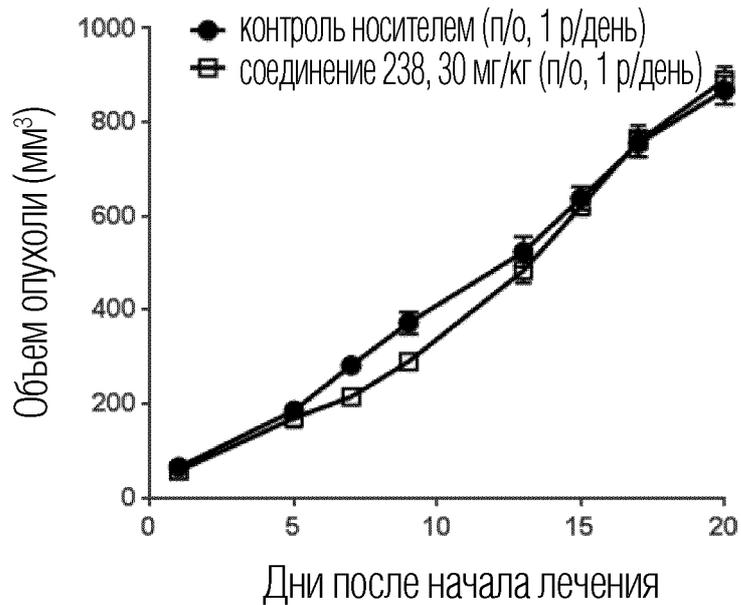
Инокуляция иммунокомпетентных мышей



ФИГ. 2б

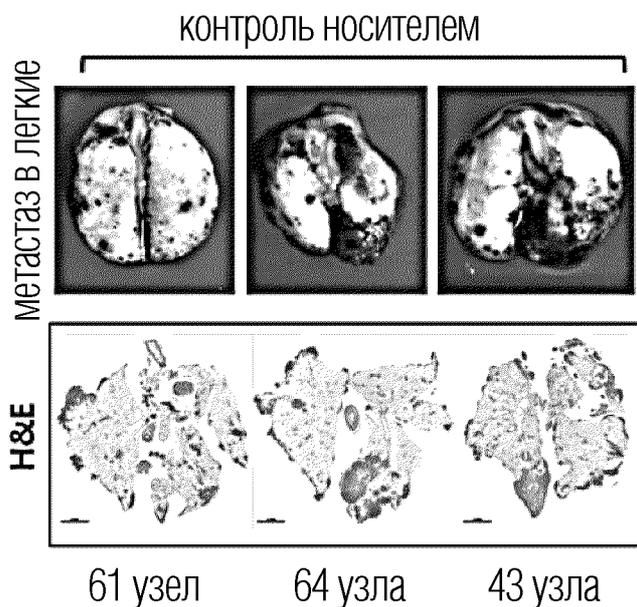
Модели опухолей молочной железы 4Т1

Инокуляция иммунодефицитных мышей



ФИГ. 3а

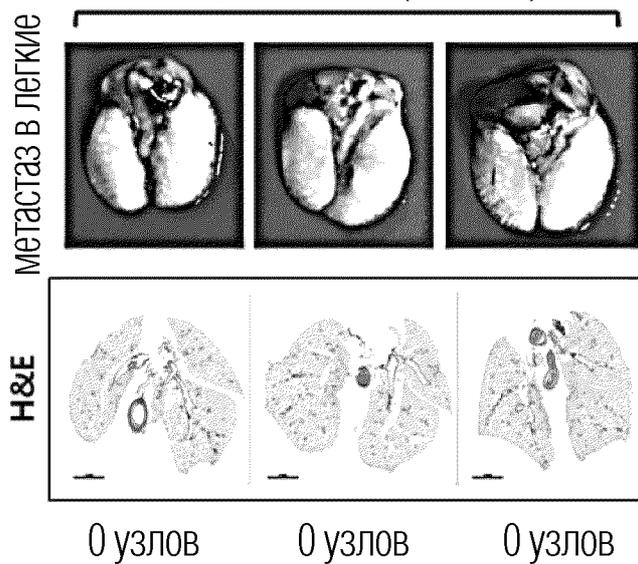
Модель метастазирования легкого B16F10



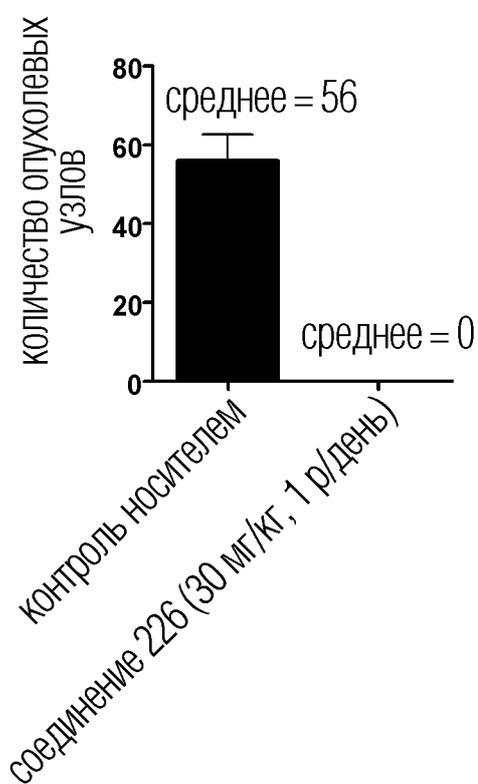
ФИГ. 3б

Модель метастазирования легкого B16F10

соединение 226 (30 мг/кг)



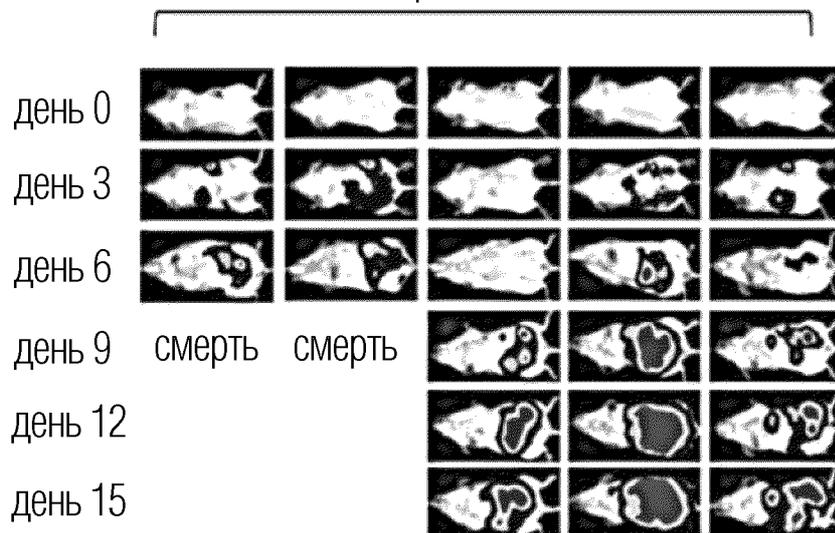
ФИГ. 3с



ФИГ. 4а

модель перитонеальных метастазов СТ26

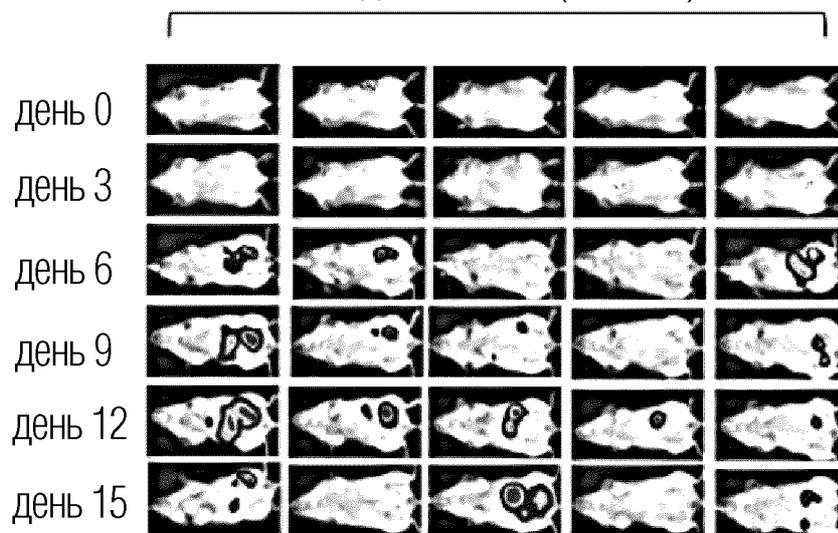
контроль носителем



ФИГ. 4б

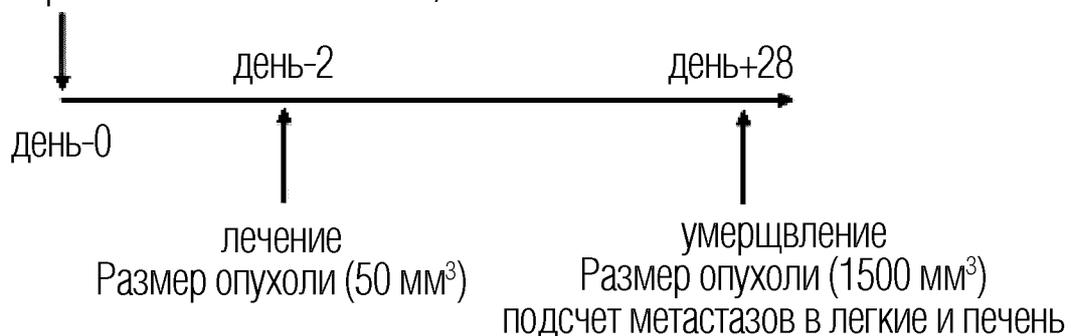
модель перитонеальных метастазов СТ26

соединение 226 (30 мг/кг)

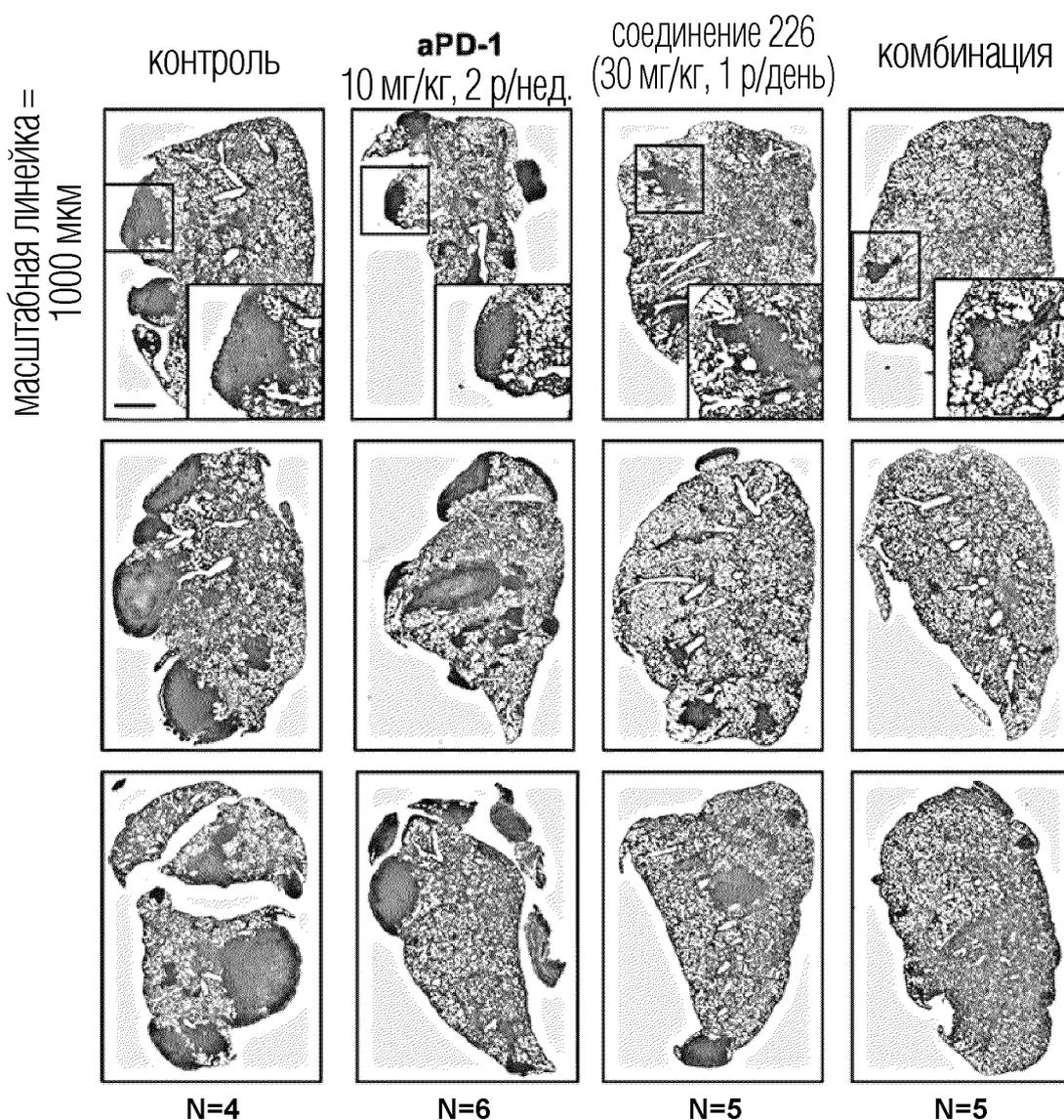


ФИГ. 5а

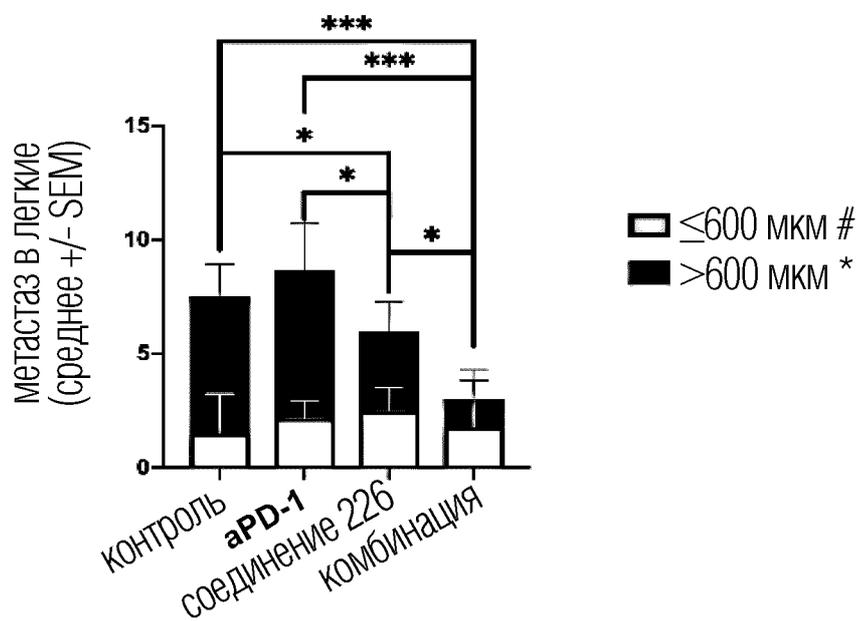
Клеточная линия 4Т1

Приживление 5×10^6 клеток/MFP

ФИГ. 5b



ФИГ. 5с



ФИГ. 6

