



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94055 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАМІЩЕНІ БЕНЗІМІДАЗОЛИ ЯК ІНГІБІТОРИ КІНАЗ

1

2

(21) a200802593

(22) 30.08.2006

(24) 11.04.2011

(86) PCT/US2006/034088, 30.08.2006

(31) 60/712,539

(32) 30.08.2005

(33) US

(31) 60/713,108

(32) 30.08.2005

(33) US

(31) 60/731,591

(32) 27.10.2005

(33) US

(31) 60/774,684

(32) 17.02.2006

(33) US

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

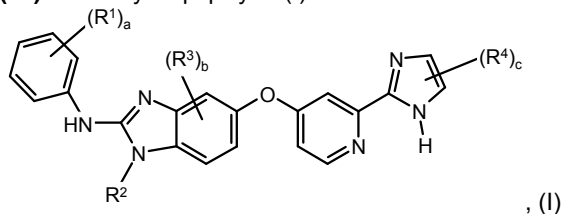
(72) АЙКАВА МІНА Е., US, АМІРІ ПЕЙМЕН, US, ДОУВ ДЖЕФФРІ Х., US, ЛЕВАЙН БАРРІ ГАСКЕЛЛ, US, МАКБРАЙД КРІСТОФЕР, US, ПІК ТЕРЕЗА Е., US, ПУН ДЕНІЕЛ ДЖ., US, РАМУРТІ САВІТРИ, IN/US, РЕНХОУВ ПОЛ А., US, ШАФЕР СІНТІЯ, US, СТЮАРТ ДЕРРІН, CA/US, СУБРАМЕНІАН ШАРАДХА, US

(73) НОВАРТИС АГ, CH

(56) US2004087626 A1 06.05.2004

WO03082272 A 09.10.2003

(57) 1. Сполука формули (I):



у якій

 R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, (C_1 - C_6 алкіл)сульфаніл, (C_1 - C_6 алкіл)сульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл та гетероарил; R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл або гало(C_1 - C_6 алкіл); R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу; R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, (C_1 - C_6 алкокси)карбоніл, амінокарбоніл, C_1 - C_6 алкіламінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл та гетероарил;де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл, гало(C_1 - C_6 алкіл), C_1 - C_6 алкоксигрупу та гало(C_1 - C_6 алкоксигрупу);

а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

b являє собою 0, 1, 2 або 3; та

с являє собою 1 або 2;

або її таутомер, стереоізомер, поліморф, складний ефір, метаболіт або проліки або фармацевтично прийнятна сіль сполуки, таутомеру, стереоізомера, поліморфу, складного ефіру, метаболіту або проліків.

2. Сполука за п. 1, у якій R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, хлор, фтор, бром, метил, етил, пропіл, бутіл, метоксигрупу, етоксигрупу, пропоксигрупу, бутоксигрупу, трифторметил, трифторетил, трифторметоксигрупу, трифторетоксигрупу, піперидиніл, C_1 - C_6 алкілпіперидиніл, піперазиніл, C_1 - C_6 алкілпіперазиніл, тетрагідрофураніл, піридиніл та піримідиніл.3. Сполука за п. 1, у якій а являє собою 1 або 2 та щонайменше один R^1 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл).4. Сполука за п. 3, у якій щонайменше один R^1 являє собою трифторметил.5. Сполука за п. 1, у якій R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл.6. Сполука за п. 1, у якій R^2 являє собою метил або етил.7. Сполука за п. 4, у якій R^2 являє собою метил.8. Сполука за п. 1, у якій b являє собою 0 та R^3 відсутній.9. Сполука за п. 1, у якій b являє собою 1 та R^3 являє собою C_1 - C_6 алкоксигрупу.10. Сполука за п. 9, у якій R^3 являє собою метоксигрупу.

(13) C2

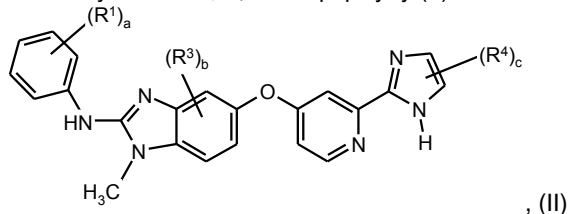
(11) 94055

(19) UA

11. Сполука за п. 1, у якій с являє собою 1 або 2 та щонайменше один з R^4 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл).

12. Сполука за п. 11, у якій щонайменше один R^4 являє собою трифторметил.

13. Сполука за п. 1, що має формулу (II):



у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, (C_1 - C_6 алкіл)сульфаніл, (C_1 - C_6 алкіл)сульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл та гетероарил;

R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, (C_1 - C_6 алкокси)карбоніл, амінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкіл-карбоніл, феніл та гетероарил;

де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

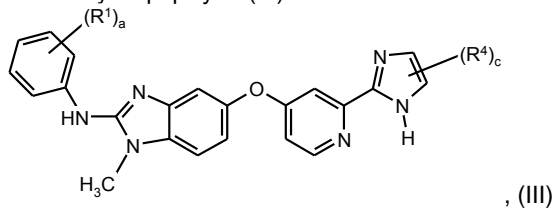
а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

б являє собою 0, 1, 2 або 3; та

с являє собою 1 або 2;

або її таутомер, стереоізомер, поліморф, складний ефір, метаболіт або проліки або фармацевтично прийнятна сіль сполуки, таутомеру, стереоізомера, поліморфу, складного ефіру, метаболіту або проліків.

14. Сполука формули (III):



у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, (C_1 - C_6 алкіл)сульфаніл, (C_1 - C_6 алкіл)сульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл та гетероарил;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкіл-карбоніл, феніл та гетероарил;

де R^1 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає

гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5; та

с являє собою 1 або 2;

або її таутомер, стереоізомер, поліморф, складний ефір, метаболіт або проліки або фармацевтично прийнятна сіль сполуки, таутомеру, стереоізомера, поліморфу, складного ефіру, метаболіту або проліків.

15. Сполука за п. 14, у якій кожен R^1 незалежно вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, хлор, фтор, бром, метил, етил, пропіл, бутил, метоксигрупу, етоксигрупу, пропоксигрупу, бутоксигрупу, трифторметил, трифторетил, трифторметоксигрупу, трифтоетоксигрупу, піперидиніл, C_1 - C_6 алкілпіперидиніл, піперазиніл, C_1 - C_6 алкілпіперазиніл, тетрагідрофураніл, піридиніл та піримідиніл.

16. Сполука за п. 15, у якій а являє собою 1 або 2 та щонайменше один з R^1 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл).

17. Сполука за п. 16, у якій щонайменше один R^1 являє собою трифторметил.

18. Сполука за п. 14, у якій а являє собою 1.

19. Сполука за п. 18, у якій R^1 являє собою трифторметил.

20. Сполука за п. 14, у якій с являє собою 1 або 2 та щонайменше один з R^4 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл).

21. Сполука за п. 20, у якій щонайменше один з R^4 являє собою трифторметил.

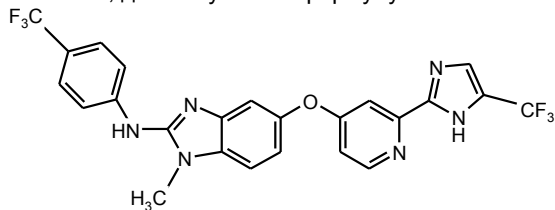
22. Сполука за п. 21, у якій с являє собою 1.

23. Сполука, вибрана із групи, що включає:

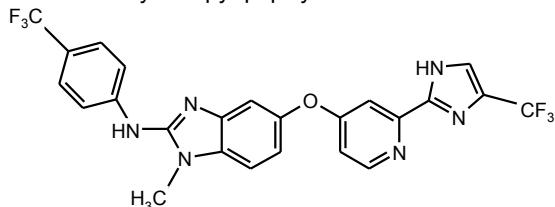
{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін,
(2-фтор-5-піридин-3-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
(2-фтор-5-піридин-4-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
(4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(3-трифторметилфеніл)амін,
(3-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
(4-хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
(4-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
(4-хлор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
(4-фтор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,

(4-етилпіперазин-1-іл)-(2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-іл)метанон,
(2-гідроксіетил)амід 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-карбонової кислоти,
{1-етил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензоімідазол-2-іл}-(2-фтор-5-трифторметилфеніл)амін,
(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{6-метокси-1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензоімідазол-2-іл}амін,
{6-метокси-1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін,
(4-етилпіперазин-1-іл)-(2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1H-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-іл)метанон,
{1-етил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін,
(2-гідроксіетил)амід 2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1H-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-карбонової кислоти,
2-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензоімідазол-2-іламіно]-5-трифторметилфеніл} та
3-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензоімідазол-2-іламіно]-6-трифторметилфеніл};
або її таутомер, стереоізомер, поліморф, складний ефір, метаболіт або проліки або фармацевтично прийнятна сіль сполуки, таутомеру, стереоізомера, поліморфу, складного ефіру, метаболіту або проліків.

24. Сполука за п. 23 або її фармацевтично прийнятна сіль, де сполука має формулу:



або таутомер сполуки або фармацевтично прийнятна сіль таутомеру формули:



25. Композиція, що містить сполуку або таутомер, або фармацевтично прийнятну сіль, або фармацевтично прийнятну сіль її таутомеру за п. 1 або 24 у поєднанні з фармацевтично прийнятим носієм.

26. Спосіб лікування ракового захворювання у людини або тварини, який полягає в тому, що людині

або тварині вводять композицію, що містить сполуку або її таутомер, або фармацевтично прийнятну сіль, або фармацевтично прийнятну сіль її таутомеру за п. 1 або 24.

27. Спосіб за п. 26, в якому композиція інгібує кінразу Raf або мутантну кінразу B-Raf.

28. Спосіб за п. 26, у якому додатково людині або тварині вводять щонайменше один додатковий агент, призначений для лікування раку.

29. Спосіб за п. 28, у якому щонайменше один додатковий агент, призначений для лікування раку, вибирають із групи, що включає іринотекан, топо-текан, гемцитабін, 5-фторурацил, леуковорин, карбоплатин, цисплатин, таксани, тезацитабін, циклофосфамід, алкалоїди вінка, іматиніб, антрацикліни, ритуксимаб та трастузумаб.

30. Спосіб за п. 26, у якому ракове захворювання являє собою меланому.

31. Спосіб за п. 26, у якому ракове захворювання являє собою рак молочної залози або рак передміхурової залози.

32. Застосування сполуки або таутомеру, або фармацевтично прийнятної солі, або фармацевтично прийнятної солі її таутомеру за п. 1 або 24 для лікування раку.

33. Застосування сполуки або таутомеру, або фармацевтично прийнятної солі, або фармацевтично прийнятної солі її таутомеру за п. 1 або 24 для одержання лікарського засобу, призначеного для лікування раку.

34. Спосіб інгібування щонайменше однієї серинові/треонінові кінрази в шляху передачі сигналу MAPK у індивідуума або лікування біологічного стану, опосередкованого серинові/треонінові кіназою у шляху передачі сигналу MAPK у індивідуума, який полягає в тому, що індивідуумові вводять композицію, що містить сполуку або її таутомер, або фармацевтично прийнятну сіль, або фармацевтично прийнятну сіль її таутомеру за п. 1 або 24.

35. Спосіб за п. 34, у якому композиція інгібує кінразу Raf.

36. Спосіб за п. 34, у якому композиція інгібує мутантну кінразу B-Raf.

37. Спосіб за п. 34, у якому біологічний стан вибирають із групи, що включає меланому, папілярний рак щитовидної залози, рак яєчника, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак легені та лейкоз.

38. Спосіб за п. 34, у якому композиція містить {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін або його фармацевтично прийнятну сіль, або таутомер, або фармацевтично прийнятну сіль його таутомеру.

39. Спосіб інгібування тирозинкіназного рецептора у індивідуума або лікування біологічного стану, опосередкованого тирозинкіназним рецептором, у індивідуума, який полягає в тому, що індивідуумові вводять композицію, що містить сполуку або її таутомер, або фармацевтично прийнятну сіль, або фармацевтично прийнятну сіль її таутомеру за п. 1 або 24, де тирозинкіназний рецептор вибирають із групи, що включає VEGFR-2, FGFR-3, c-Kit, PDGFR-β та CSF-IR.

40. Спосіб за п. 39, у якому біологічний стан, вибирають із групи, що включає лейкоз тучних клітин, еритролейкоз, пухлини зародкових клітин, дрібно-клітинний рак легені, пухлини, що належать до строми шлунково-кишкового тракту, гострий мієлолейкоз, нейробластоми, меланому, мієломну хворобу, рак яєчника та рак молочної залози.

Перехресне посилання на пов'язані заявки

Дана заявка претендує на пріоритет попередніх заявок на патент U.S. серійний номер 60/712539, зареєстрований 30 серпня 2005 року, U.S. серійний номер 60/713108, зареєстрований 30 серпня 2005 року, U.S. серійний номер 60/731591, зареєстрований 27 жовтня 2005 року, U.S. серійний номер 60/774684, зареєстрований 17 лютого 2006 року, кожна з яких повністю включена в даний опис як посилання.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до нових заміщених бензімідазолних похідних, їх таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів та проліків, до фармацевтично прийнятних солей зазначених сполук, їх таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів і проліків, до композицій, що містять кожний із зазначених вище варіантів у поєднанні з фармацевтично прийнятними носіями, і до застосування кожного з вищевказаних варіантів або окремо, або в поєднанні з найменше з одним додатковим терапевтичним агентом для профілактики або лікування раку.

Передумови створення винаходу

Відомі кінази, що пов'язані з онкогенезом, до яких відносяться серінові/треонінові кінази Raf і тирозинкіназні рецептори (RTK).

Серінові/треонінові кінази є основними компонентами модуля шляху передачі сигналу Ras/мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK), що контролює комплекс програм транскрипції у відповідь на екзогенні клітинні стимули. Гени Raf кодують висококонсервативні серін-треонінспецифічні протеїнкінази, які, як відомо, зв'язуються з онкогеном *ras*. Вони є частиною шляху сигнальної трансдукції, що, імовірно, складається з тирозинкіназних рецепторів, *p21-ras*, протеїнкіназ Raf, Mek1- (активатор ERK (позаклітинна регульована кіназа) або MAPKK)-кінази та ERK- (MAPK)-кінази, які, зрештою, фосфорилують фактори транскрипції. У цьому шляху кінази Raf активуються Ras і фосфорилують та активують дві ізоформи кінази мітоген-активованої протеїнкінази (яку позначають також як Mek1 та Mek2), які являють собою треонінові/тирозинові кінази з подвійною специфічністю. Обидві ізоформи Mek активують мітоген-активовані кінази 1 та 2 (MAPK, які називають також регульованими позаклітинним лігандом кіназою 1 та 2 або Erk1 та Erk2). MAPK фосфорилують цілий ряд субстратів, включаючи фактори транскрипції, і в результаті беруть участь у їх програмах транскрипції. Кіназа Raf впливає на Ras/MAPK-шлях і регулює кілька клітинних функ-

цій, таких як проліферація, диференціювання, виживання, онкогенна трансформація та апоптоз.

У дослідженнях, у яких використовували понижуючу регуляцію та домінантне інгібування мутантів Raf у клітинах ссавців, а також у дослідженнях, у яких застосовували біохімічні та генетичні технології для створення модельних організмів, продемонстровані як важлива роль, так і місце знаходження Raf у цілому ряді шляхів передачі сигналів.

У багатьох випадках активація Raf рецепторами, які симулюють фосфорилування клітинного тирозину, залежить від активності Ras, що свідчить про те, що Ras здійснює свою функцію до Raf у шляху передачі сигналу. Після активації Raf-1 фосфорилує та активує Mek1, що приводить до поширення сигналу на розташовані по його ходу ефектори, такі як MAPK (мітоген-активована протеїнкіназа; Crews та ін., Cell 74, 1993, с. 215). Серінові/треонінові кінази Raf вважаються первинними ефекторами Ras, які беруть участь у проліферації клітин тварин (Avruch та ін., Trends Biochem. Sci. 19, 1994, с. 279).

Кіназа Raf має три різні ізоформи Raf-1 (c-Raf), A-Raf та B-Raf, які розрізняються за їх здатністю взаємодіяти з Ras, активувати шлях кінази MAPK, їх розподілом у тканинах і субклітинною локалізацією (Marias та ін., Biochem. J. 351, 2000, стор. 289-305; Weber та ін., Oncogene 19, 2000, стор. 169-176; Pritchard та ін., Mo. Cell. Biol. 75, 1995, стор. 6430-6442). Активуюча мутація одного з генів Ras виявлена приблизно у 20% всіх пухлин, а активація Ras/Raf/MEK/ERK-шляхи виявлені приблизно у 30% всіх пухлин (Bos та ін., Cancer Res. 49, 1989, стор. 4682-4689; Hoshino та ін., Oncogene 18, 1999, стор. 813-822). У сучасних дослідженнях встановлено, що мутація B-Raf у невоспалюючій стадії, що має вирішальне значення в ініціації меланоцитної неоплазії (Pollock та ін., Nature Genetics 25, 2002, стор. 1-2). Крім того, у дослідженнях, проведених в останні роки, встановлено, що активуюча мутація у кіназному домені B-Raf присутня приблизно у 66% меланом, 12% карцином товстої кишки та 14% випадків раку легені (Davies та ін., Nature 417, 2002, стор. 949-954; Yuen та ін., Cancer Research 62, 2002, стор. 6451-6455; Brose та ін., Cancer Research 62, 2002, стор. 6997-7000).

Меланоми, які продовжують залишатися важливими захворюваннями, що вимагають медичного втручання, являють собою комплексне мультигенне захворювання з несприятливим прогнозом, насамперед на прогресуючій метастатичній стадії. Активуючі соматичні мутації проонкогену B-Raf у цей час описані як характерні для різних злоякісних захворювань і найбільше часто зустрічаються

при меланомах. Приблизно в 70% випадків меланом відбувається експресія мутантної та активованої форми B-Raf (V600E), що робить її прекрасною мішенню для розробки лікарських засобів. Крім того, в інших 10-15% випадків меланом відбувається експресія мутантної N-Ras, що додатково демонструє важливість MAPK-шляху для росту та виживання клітин меланом.

Інгібітори Ras/Raf/MEK/ERK-шляху на рівні кінази Raf можуть мати ефективність як терапевтичних агентів, призначених для лікування пухлин зі надекспресованими та мутантними тирозинкіназними рецепторами, активованими внутрішньоклітинними тирозинкіназами, пухлин з аномальною експресією Grb2 (білок-адаптер, що забезпечує стимуляцію Ras за допомогою фактора обміну Sos), а також пухлин, що несуть мутації, що активують, саму Raf. У проведених раніше клінічних дослідженнях встановлено, що інгібітори кінази Raf-1, які інгібують також B-Raf, є перспективними як терапевтичні агенти для терапії раку (Crump, *Current Pharmaceutical Design* 8, 2002, стор. 2243-2248; Sebastien та ін., *Current Pharmaceutical Design* 8, 2002, стор. 2249-2253).

Як було встановлено, що порушення експресії Raf у клітинних лініях, вивчене із застосуванням технології антисмислової РНК, пригнічує як Ras-, так і Raf-опосередкований онкогенез (Kolch та ін., *Nature* 349, 1991, стор. 416-428; Monia та ін., *Nature Medicine* 2(6), 1996, стор. 668-675). Встановлено також, що введення деактивуючих антитіл до кінази Raf або коекспресія домінантно-негативної кінази Raf або домінантно-негативної MEK, що є субстратом кінази Raf, приводить до реверсії трансформованих клітин до нормального фенотипу за ознакою росту (див., Daum та ін., *Trends Biochem. Sci.* 19, 1994, стор. 474-80; Fridman та ін., *J Biol. Chem.* 269, 1994, стор. 30105-30108).

Описано кілька інгібіторів кінази Raf, які мають ефективність по відношенню до інгібування проліферації пухлинних клітин в аналізах *in vitro* та/або *in vivo* (див., наприклад, U.S. 6391636, 6358932, 6037136, 5717100, 6458813, 6204467 та 6268391). В інших патентах і заявках на патент запропоноване застосування інгібіторів кінази Raf для лікування лейкозу (див., наприклад, U.S. 6268391 та 6204467 та опубліковані заявки на патент США 20020137774; 20020082192; 20010016194; і 20010006975), або для лікування раку молочної залози (див., наприклад, U.S. 6358932, 5717100, 6458813, 6268391 та 6204467, і опубліковану заявку на патент США 20010014679).

У рості ракових клітин велику роль грає також ангіогенез. Відомо, що, коли скупчення (гніздо) ракових клітин досягає певного розміру, приблизно 1-2 мм у діаметрі, повинна розвиватися система постачання крові до ракових клітин, необхідна для швидкого росту пухлини, оскільки дифузія виявляється недостатньою для постачання до ракових клітин необхідної кількості кисню та поживних речовин. Таким чином, інгібування ангіогенезу може інгібувати ріст ракових клітин.

Тирозинкіназні рецептори (RTK) являють собою трансмембранні поліпептиди, які регулюють

ріст і диференціювання клітин, ремодуючи та регулюючи тканину дорослого організму (Mustonen T. і ін., *J Cell Biology* 129, 1995, стор. 895-898; van der Geer P. і ін., *Ann Rev. Cell Biol.* 10, 1994, стор. 251-337). Відомо, що поліпептидні ліганди, такі як фактори росту та цитокіни, активують RTK. Шлях передачі сигналу RTK включає зв'язування ліганду та зміну конформації в зовнішньому домені рецептору, що приводить до димеризації рецептору (Lymboussaki A. «Vascular. Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors», Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, 1999; Ullrich A. і ін., *Cell* 61, 1990, стор. 203-212). Зв'язування ліганду з RTK приводить до трансфосфорилювання рецептору на певних залишках тирозину та наступної активації каталітичних доменів для фосфорилювання цитоплазматичних субстратів (див. там же).

Для судинного ендотелію специфічними є два підсмейства RTK. До них відноситься підсмейство судинного ендотеліального фактору росту (VEGF) і підсмейство Tі-рецептору. До класу V RTK відносяться VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR (людський), Flk-1 (мишачий)) VEGFR3 (FLT-4) (Shibuya M. і ін., *Oncogene* 5, 1990, стор. 519-525; Terman B. і ін., *Oncogene* 6, 1991, стор. 1677-1683; Aprelikova O. і ін., *Cancer Res.* 52, 1992, стор. 746-748). Встановлено, що представники підсмейства VEGF мають здатність індукувати судинну проникність і проліферацію ендотеліальних клітин, і вони описані також як основний індуктор ангіогенезу та васкулогенезу (Ferrara N. і ін., *Endocrinol. Rev.* 18, 1997, стор. 4-25). Відомо, що VEGF специфічно зв'язується з RTK, у тому числі FLT-1 та Flk-1 (DeVries, C. і ін., *Science* 255, 1992, стор. 989-991; Quinn T. і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1993, стор. 7533-1537). VEGF стимулює міграцію та проліферацію ендотеліальних клітин та індукує ангіогенез як *in vitro*, так і *in vivo* (Connolly D. і ін., *J. Biol. Chem.* 264, 1989, стор. 20017-20024; Connolly D. і ін., *J. Clin. Invest.* 84, 1989, стор. 1470-1478; Ferrara N. і ін., *Endocrinol. Rev.* 18, 1997, стор. 4-25; Leung D. і ін., *Science*, 246, 1989, стор. 1306-1309; Plouet J. і ін., *EMBO J* 5, 1989, стор. 3801-3806).

Вивчення різних систем культивованих ендотеліальних клітин дозволило встановити, що VEGFR2 опосередкує більшість впливів VEGF на ангіогенез, що передаються по ходу передачі сигналу (Wey S. і ін., *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 2, 2004, стор. 37-45). VEGFR2-опосередковувана проліферація ендотеліальних клітин, імовірно, включає активацію Ras/Raf/Mek/Erk-шляхів (Veikkola T. і ін., *Cancer Res* 60, 2000, стор. 203-212). Експресія VEGFR2 виявлена при меланомі, раку молочної залози, раці сечового міхура, раці легені, раці щитовидної залози, раці передміхурової залози та раку яєчника (див. Wey та ін., вище). Встановлено, що нейтралізуючі моноклональні антитіла до VEGFR2 (KDR) мають ефективність відносно блокади ангіогенезу пухлин (див. Kim та ін., *Nature* 362, 1993, стор. 841; Rockwell та ін., *Mol. Cell Differ.* 3, 1995, стор. 315). Оскільки, як відомо, ангіогенез має ви-

рішальне значення для росту пухлини та може контролюватися VEGF та VEGF-RTK, вживали спроби створення сполук, що інгібують і сповільнюють ангиогенез та що інгібують VEGF-RTK.

Кіназний рецептор тромбоцитарного фактору росту (PDGFR) є іншим типом RTK. Експресія PDGF виявлена в деяких різних типах солідних пухлин, від гліобластом та остеосарком до карцином передміхурової залози. У цих різних типах пухлин біологічна роль передачі PDGF-сигналу може варіюватися від аутокринної стимуляції росту ракових клітин до більш тонких паракринних взаємодій, включаючи прилеглу строму та ангиогенез. PDGF взаємодіє з тирозинкіназними рецепторами PDGFR α і PDGFR β . Таким чином, можна чекати, що інгібування кіназної активності PDGFR невеликими молекулами буде впливати на ріст та ангиогенез пухлини.

Кіназні рецептори фактору росту фібробластів (FGFR) являють собою інший тип RTK. Фактори росту фібробластів відносяться до сімейства поліпептидів факторів росту, які беруть участь у різних видах активності, включаючи мітогенез, ангиогенез і загоєння ран. До них відноситься сімейство родинних, але що мають індивідуальні розходження, тирозинкіназних рецепторів, що містять позаклітинний домен або з 2, або з 3 імуноглобулін (Ig)-подібними доменами, трансмембранний домен і цитоплазматичний кіназний домен. Ідентифіковані рецептори фактору росту фібробластів включають FGFR1 (Ruta M. і ін., *Oncogene* 3, 1988, стор. 9-15); FGFR2 (Dionne C. і ін., *Cytogenet. Cell Genet.* 60, 1992, стор. 34-36); FGFR3 (Keegan K. і ін., *Proc. Nat. Acad. Sc* 88, 1991, стор. 1095-1099); та FGFR4 (Partanen J. і ін., *EMBO J.* 10, 1991, стор. 1347-1354).

Висвітлено роль рецепторів факторів росту фібробластів, насамперед FGFR3, при раку. Порухення регуляції онкогенів шляхом транслокації в локус важкого ланцюгу імуноглобуліну (Ig) 14q32 являє собою ініціюючий момент у патогенезі В-клітинних пухлин. При множинній мієломі транслокація в локус Ig зустрічається в 20-60% випадків. Для більшості транслокацій хромосома-партнер є невідомою; для інших ідентифіковане широке розмаїття хромосом-партнерів, серед яких часто зустрічається тільки одна хромосома 11q13. Bergsagel зі співавторами ідентифікували незаконне перемикання рекомбінації фрагментів (визначені як утримуючі послідовності тільки з однієї області перемикання) як потенційні маркери випадків транслокації в областях перемикання Ig в 15 з 21 лінії мієлом, включаючи 7 з 8 каріотипованих ліній, які мали 14q32-транслокацію, що виявляється. Встановлено, що ці точкові розриви, що зачіпають 6 наступних локусів хромосоми: 4p16.3; 6; 8q24.13; 11q13.3; 16q23.1; і 21q22.1 (Bergsagel та ін., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93, 1996, стор. 13931-13936, 1996). Chesi та ін., *Nature Genet.* 16, 1997, стор. 260-264), утворюють каріотипову мовчазну транслокацію t(4;14)(p16.3;q32.3) в 5 лініях клітин мієлом і що-найменше в 3 з 10 первинних пухлин, пов'язаних із множинною мієломою, що приводить до підвищеного рівня експресії та активації мутацій у FGFR3. Точкові розриви на хромосомі-4 об'єднані в клас-

терну область, що складається з 70 т.п.н., центрально відносно FGFR3, що, імовірно, є онкогеном з порушеною регуляцією. У двох ліній мієлом та однієї первинної лінії пухлини із зазначеною транслокацією вибірково експресується алель FGFR3, що містить мутації, що активують, які раніше ідентифіковані при смертельній карликовості: tyr373 на cys, lys650 на glu та lys650 на met. Для K650E в експериментах по трансфекції доведена конститутивна активація FGFR3 за відсутності ліганду. Chesi зі співавторами (1997) висловили припущення про те, що після t(4;14)-транслокації соматична мутація при прогресуванні пухлини часто приводить до одержання білку FGFR3, що має активність за відсутності ліганду.

Rasmussen T. і ін. виявили частоту зустрічальності від 3 до 24% t(4;14)-транслокації при множинній мієломі (Rasmussen T. і ін., *Br. J. Haematol.* 117, 2002, стор. 626-628, 2002). Істотно менша частота транслокації виявлена у пацієнтів з моноклональною гамопатією невстановленої етіології (MGUS), що дозволяє припустити, що вона відіграє роль у перетворенні MGUS у множинну мієлому. t(4;14)-транслокація зачіпає 2 потенційних онкогена: FGFR3 і постійний домен множинної мієломи (MMSET). Rasmussen і співавторами (2002) визначили частоту порушення регуляції FGFR3 і його передбачувану роль при множинній мієломі. Вони виявили порушену регуляцію експресії FGFR3 в 16 з 110 (14,5%) зразках множинної мієломи кісткового мозку.

Крім того, отримані додаткові дані, що демонструють роль FGFR3 при карциномах (Cappellen D. і ін., (Letter) *Nature Genet.* 23, 1999, стор. 18-20. Cappellen і співавторами виявили, що експресію конститутивно активованого FGFR3 у великій частині двох розповсюджених типів епітеліального раку, а саме, сечового міхура та шийки матки. FGFR3, імовірно, є найбільш широко розповсюдженим мутантним онкогеном при раку сечового міхура, що є мутантним більш ніж у 30% випадків. FGFR3, імовірно, опосередковує протилежні дії, проявляючи активність як негативний регулятор росту кісткової тканини та як онкоген при деяких типах пухлини. Всі соматичні міссенс-мутації FGFR3, виявлені при таких типах раку, виявилися ідентичні ембріональним активуючим мутаціям, які викликають смертельну дисплазію (зазначені автори повідомили, наявність такої еквівалентності у двох мутаціях, оскільки ізоформа FGFR3b, що експресується у епітеліальних клітинах, містить на 2 амінокислоти більше, ніж ізоформа FGFR3c, що експресується в кістковій тканині). Із двох модифікацій FGFR3 в епітеліальних пухлинах мутація S249C виявилася найбільш широко розповсюдженою, зустрічаючись у 5 з 9 випадків раку сечового міхура та у 3 з 3 випадків раку шийки матки.

Були отримані також дані, що свідчать про те, що активований FGFR3 є мішенню для розщеплення лізомами за допомогою c-Cbl-опосередкованої убіквітіназації та що активуючі мутації виявлені у пацієнтів з ахондроплазією і спорідненими хондроплазіями, порушують цей процес, приводячи до рециклізації активованих рецепторів та ампліфікації FGFR3-сигналів (Cho та

ін., Proc. Nat. Acad. Sci. 101, 2004, стор. 609-614). Cho із співавторами висловили припущення про те, що цей механізм бере участь у молекулярному патогенезі ахондроплазії і являє собою потенційну мішень для терапевтичного втручання. Порушення спрямованого переносу лізосом є адитивним щодо інших передбачуваних механізмів, запропонованих для пояснення патогенезу ахондроплазії.

Інші результати свідчать про те, що FGFR2 та FGFR3 є важливими факторами онкогенезу (Jang J.H. і ін., «Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers» Cancer Res. 61(9), 2001, стор. 3541-3543). З урахуванням їх значення для множинної мієломи, раку сечового міхура та онкогенезу, розробка інгібіторів тирозинкіназних рецепторів фактору росту фібробласту, насамперед інгібіторів FGFR2 та FGFR3, повинна мати важливе значення для лікування різних типів раку.

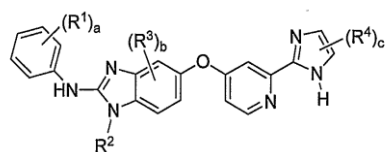
c-Kit являє собою інший тирозинкіназний рецептор, що належить до сімейства рецепторів PDGF, і він у нормі експресується в гематопоетичних клітинах-попередниках, тучних клітинах і зародкових клітинах. Експресія c-kit виявлена при декількох типах раку, включаючи лейкоз тучних клітин, пухлини зародкових клітин, дрібноклітинний рак легені, пухлини, що відносяться до строми шлунково-кишкового тракту, гострий мієлолейкоз (ОМЛ), еритролейкоз, нейробластому, меланому, карциному яєчника, карциному молочної залози (Heinrich M. C. і ін., J. Clin. Onc. 20, 6, 2002, стор. 1692-1703 (оглядова стаття); Smolich B. D. і ін., Blood, 97, 5, стор. 1413-1421).

Надекспресія CSF-IR, рецептор колонієстимулюючого фактору-1 (CSF-I), виявлена при деяких людських карциномах, включаючи карциному молочної залози, яєчника, ендометрію, легені, нирки, підшлункової залози і передміхурової залози (Sari E., Exp. Biol. Med. 229, 2004, стор. 1-11). CSF-IR являє собою тирозинкіназний рецептор, що при активації його лігандом CSF-I, запускає шляхи трансдукції сигналів, що контролюють клітинну проліферацію та диференціювання. CSF-IR експресується в молочної залозі при вагітності та лактації. Аномальна експресія CSF-IR корелювала з 58% всіх випадків раку молочної залози та 85% випадків інвазивної карциноми молочної залози (див. Sari, вище).

Продовжує зберігатися потреба в сполуках, які інгібують проліферацію капілярів, інгібують ріст пухлин, сприяють лікуванню раку, модулюють припинення клітинного циклу та/або інгібують одну або кілька таких молекул, як Ras, Raf, мутант B-Raf, VEGFR2 (KDR, Flk-1), FGFR2/3, c-Kit, PDGFR β , CSF-IR, і фармацевтичних композиціях і лікарських засобах, які містять такі сполуки. Зберігається також потреба в розробці способів введення таких сполук, фармацевтичних композицій і лікарських засобів пацієнтам та індивідуумам, які мають в цьому потребу.

Короткий опис сутності винаходу

Нові заміщені бензімідазолні похідні являють собою сполуки формули (I):



(I)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл і гетероарил;

R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл або гало(C_1 -алкіл);

R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, C_1 - C_6 алкіламінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл і гетероарил;

де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл, гало(C_1 -алкіл), C_1 - C_6 алкоксигрупу та гало(C_1 -алкокси)групу;

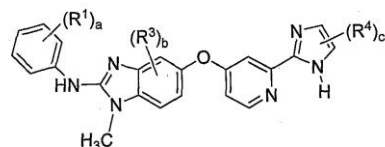
a являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

b являє собою 0, 1, 2 або 3; та

c являє собою 1 або 2;

або їх таутмери, стереоізмери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутмерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

В інших варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазолні похідні являють собою сполуки формули (II):



(II)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл і гетероарил;

R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл і гетероарил;

де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, не-

залежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

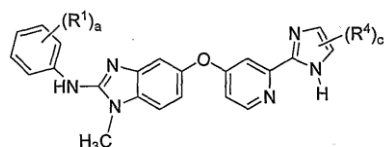
а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

б являє собою 0, 1, 2 або 3; та

с являє собою 1 або 2;

або їх таутомери, стереоізомери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

В інших варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формули (III):



(III)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл та гетероарил;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл і гетероарил;

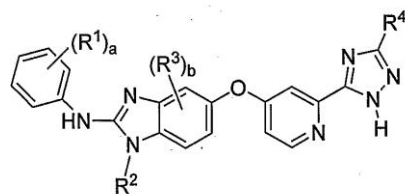
де R^1 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5; та

с являє собою 1 або 2;

або їх таутомери, стереоізомери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

Винахід відноситься також до сполук формули (IV):



(IV)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл і гетероарил;

R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл або гало(C_1 - C_6 алкіл);

R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний

із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, C_1 - C_6 алкіламінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл та гетероарил;

де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

б являє собою 0, 1, 2 або 3;

або до їх таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків або фармацевтично прийнятних солей сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

В інших варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I)-(IV), у яких R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, хлор, фтор, бром, метил, етил, пропіл, бутіл, метоксигрупу, етоксигрупу, пропоксигрупу, бутоксигрупу, трифторметил, трифторетил, трифторметоксигрупу, трифторетоксигрупу, трифторметилсульфаніл, піперидиніл, C_1 - C_6 алкілпіперидиніл, піперазиніл, C_1 - C_6 алкілпіперазиніл, тетрагідрофураніл, піридиніл, піримідиніл. У інших варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I)-(IV), у яких а являє собою 1 або 2, і щонайменше один R^1 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл), такий як трифторметил. В інших варіантах здійснення винаходу, нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I) і (IV), у яких R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл, такий, наприклад, як метил або етил. В інших варіантах здійснення винаходу, нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I), (II) і (IV), у яких б являє собою 0 та, отже, у цьому випадку R^3 відсутній. У альтернативних варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I)-(IV), у яких в являє собою 1 та R^3 являє собою C_1 - C_6 алкоксигрупу, таку, наприклад, як метоксигрупа. Ще в одному варіанті здійснення винаходу, нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I)-(III), у яких с являє собою 1 або 2 і щонайменше один R^4 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл), такий, наприклад, як трифторметил.

У іншому варіанті втілення даного винаходу забезпечені способи лікування пов'язаних з Raf захворювань у людини або тварини, що потребує такого лікування, що включають введення зазначеному індивідуумові сполуки, що є будь-яким варіантом даного винаходу, або її фармацевтично прийнятну сіль формули (I), (II), (III) або (IV) у кількості, ефективній для зниження або попередження росту пухлини в індивідуума.

Наступними об'єктами даного винаходу є спо-

особи лікування пов'язаних з Raf захворювань у людини або тварини, що потребує такого лікування, що включають введення зазначеному індивідуумові сполуки, що є будь-яким варіантом даного винаходу, або її фармацевтично прийнятну сіль формули (I), (II), (III) або (IV) у кількості, ефективній для зниження або попередження росту пухлини в індивідуума, у поєднанні щонайменше з одним додатковим агентом, призначеним для лікування раку.

Іншими об'єктами даного винаходу є терапевтичні композиції, що містять щонайменше одну сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль формули (I), (II), (III) або (IV) у поєднанні щонайменше з одним або декількома додатковими агентами, призначеними для лікування раку, які звичайно застосовують у терапії раку. Сполуки, запропоновані у винаході, можна застосовувати для лікування різних типів раку, включаючи карциноми (наприклад, легені, підшлункової залози, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура або товстої кишки), меланому, мієлоїдні розлади (наприклад, мієлолейкоз, множинну мієлому та еритролейкоз), аденоми (наприклад, ворсинчаста пухлина товстої кишки) і саркоми (наприклад, остеосаркома).

Іншим об'єктом даного винаходу є способи інгібування щонайменше однієї серінової/треонінової кінази в шляху передачі сигналу MAPK в індивідуума або лікування біологічного стану, опосередкованого серіновою/треоніновою кіназою шляху передачі сигналу MAPK в індивідуума, що полягають у тому, індивідуумові вводять терапевтичну композицію, що містить щонайменше одну сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль формули (I), (II), (III) або (IV), що має ефективність відносно інгібування шляху передачі сигналу MAPK. Терапевтичні композиції можна застосовувати для лікування пацієнтів, що потребують лікування такими інгібіторами (наприклад, що страждають від раку, що опосередковується аномальною передачею сигналу MAPK). Одним з варіантів здійснення винаходу є способи інгібування кінази Raf у індивідуума, що полягають у тому, що вводять терапевтичну композицію, що містить {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін і його таутомер, стереоізомер, поліморф, складний ефір, метаболіт або проліки або фармацевтично прийнятну сіль сполуки, таутомеру, стереоізомеру, поліморфу, складного ефіру, метаболіту, або проліків.

Наступним об'єктом даного винаходу є способи інгібування щонайменше одного тирозинкіназного рецептору, вибраного з групи, що включає VEGFR-2, PDGFR- β , pERK, bFGF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, c-Kit та CSF-IR, у індивідуума, або лікування біологічного стану, опосередкованого щонайменше одним з VEGFR-2, PDGFR- β , pERK, bFGF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, c-Kit та CSF-IR, що полягають у тому, що вводять терапевтичну композицію, що містить щонайменше одну сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль формули (I), (II), (III) або (IV), що має ефективність у відношенні інгібування тирозинкіназного рецептору у індивідуума. Терапевтичні сполуки можна застосовувати

для лікування пацієнтів, які мають потребу у лікуванні такими інгібіторами (наприклад, пацієнтів, що страждають раком, опосередковуваним аномальною передачею сигналу тирозинкіназного рецептору). Одним з варіантів здійснення винаходу є способи інгібування тирозинкіназного рецептору, вибраного із групи, що включає VEGFR-2, PDGFR- β , pERK, bFGF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, c-Kit та CSF-IR, індивідуумові, що полягають у тому, що вводять терапевтичну композицію, що містить {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін або його таутомер, стереоізомер, поліморф, складний ефір, метаболіт або проліки або фармацевтично прийнятну сіль сполуки, таутомеру, стереоізомеру, поліморфу, складного ефіру, метаболіту або проліків.

Винахід відноситься також до композицій, способів застосування та способів одержання, які більш докладно будуть описані нижче.

Короткий опис малюнків

Вищевикладені об'єкти та ряд супутніх переваг даного винаходу стануть більш зрозумілими з посиленням на викладений нижче докладний опис у поєднанні із прикладеними малюнками, на яких показано:

на Фіг. 1 - графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин людської меланоми лінії A375M у мишей після обробки сполукою, запропонованою у винаході, що описано в прикладі 78;

на Фіг. 2A и 2B - зображення результатів, отриманих за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах людської меланоми лінії A375M у мишей через 4 год. (Фіг. 2A) і 24 год. (Фіг. 2B) після обробки сполукою, запропонованою у винаході, наприклад, описаною у прикладі 79;

на Фіг. 3 - графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин людського раку товстої кишки лінії HT29P у мишей після обробки сполукою, запропонованою у винаході, що описано в прикладі 80;

на Фіг. 4A, 4B и 4B - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах людського раку товстої кишки лінії HT29P через 1 год. (Фіг. 4A), 4 год. (Фіг. 4B) та 24 год. (Фіг. 4B) після обробки сполукою, запропонованою у винаході, що описано в прикладі 81;

на Фіг. 5 - проілюстрований шлях передачі сигналу MAPK, що включає Ras, Raf, MEK та ERK, і передбачувані сайти інгібування в напрямку його поширення від кінази Raf за допомогою сполуки з прикладу 1, що описано в прикладах 82-86;

на Фіг. 6A, 6B и 6B - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у клітинах лінії A375M (Фіг. 6A), клітинах лінії SK-MEL2 (Фіг. 6B) і клітинах лінії CHL-I (Фіг. 6B) через 4 год. після інкубації культури з різними концентраціями сполуки із Прикладу 1, що описано в прикладі 83;

на Фіг. 7A - графік залежності відповіді від до-

зи у вигляді зменшення середнього об'єму пухлин людської меланоми лінії A375M (B-Raf V600E) у мишей після обробки пероральною дозою 10 мг/кг, 30 мг/кг або 100 мг/кг сполуки із Прикладу 1, що описано в прикладі 84;

на Фіг. 7Б - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у клітинах лінії A375M у мишей через 8 год. після 14-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в прикладі 84;

на Фіг. 7В - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у клітинах лінії A375M у мишей через 24 год. після 14-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в прикладі 84;

на Фіг. 7Г - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про модуляцію маркерів, розташованих у напрямку його поширення від кінази Raf, у клітинах лінії A375M через 24 год. після 14-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в прикладі 84;

на Фіг. 8А - графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин злоякісної меланоми лінії MEXF276 (B-Raf V600E) у мишей після обробки сполукою із Прикладу 1, що описано у Прикладі 85;

на Фіг. 8Б - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії MEXF276 у мишей через 4 год. після 20-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано у Прикладі 85;

на Фіг. 8В - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії MEXF276 через 4 год. після 20-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано у Прикладі 85;

на Фіг. 9А - графічне зображення інгібування середнього об'єму пухлин злоякісної меланоми лінії MEXF1341 (N-Ras Q61K) у мишей після обробки сполукою із прикладу 1, що описано у Прикладі 85;

на Фіг. 9Б - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії MEXF1341 у мишей через 4 год. після 20-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано у Прикладі 85;

на Фіг. 9В - зображення результатів, отриманих за допомогою ПААГ, які свідчать про модуляцію маркерів, розташованих у напрямку поширення сигналу від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії MEXF 1341 через 4 год. після 20-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано у Прикладі 85;

на Фіг. 10А - графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин колоректальної карциноми лінії HCT-116 (K-Ras G13D) у мишей після обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в прикладі 86;

на Фіг. 10Б - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf

у пухлинних клітинах лінії HCT-116 через 4 год. після 3-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в Прикладі 86;

на Фіг. 10В - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії HCT-116 через 8 год. після 3-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в Прикладі 86;

на Фіг. 10Г - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії HCT-116 через 24 год. після 3-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в Прикладі 86;

на Фіг. 11 - графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин колоректальної карциноми лінії HT-29 (B-Raf V600E) у мишей після обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в Прикладі 86;

на Фіг. 12А - графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин гострого мієлолейкозу лінії MV4-11 (FLT3 ITD) у мишей після обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в Прикладі 86;

на Фіг. 12Б - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії MV4-11 у мишей через 4 год. після 3-ої обробки сполукою із Прикладу 1, що описано в Прикладі 86;

на Фіг. 13 - графік, що свідчить про інгібування VEGF-опосередкованого ангіогенезу на моделі CHO-VEGF з використанням матригелю (Matrigel) після обробки 10 мг/кг, 30 мг/кг та 100 мг/кг сполуки із Прикладу 1, що описано в Прикладі 88;

на Фіг. 14А - графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин меланоми лінії A375M у мишей після обробки 100 мг/кг сполуки із Прикладу 1 з використанням схеми введення лікарського засобу q2d, q3d або q4d, що описано в Прикладі 89;

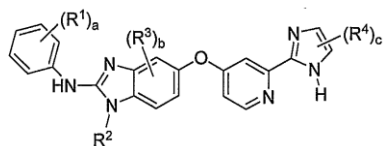
на Фіг. 14Б - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії A375M у мишей через 8 год., 24 год., 48 год. після 5-ої обробки сполукою із Прикладу 1 з використанням схеми введення лікарського засобу q2d, що описано в Прикладі 89;

на Фіг. 14В - результати, отримані за допомогою ПААГ, які свідчать про інгібування передачі сигналу в напрямку його поширення від кінази Raf у пухлинних клітинах лінії A375M у мишей через 48 год., 72 год. та 96 год. після 3-ої обробки сполукою із Прикладу 1 з використанням схеми введення лікарського засобу q4d, що описано в Прикладі 89; та

на Фіг. 15 - графік, що демонструє взаємозв'язок між обробкою пухлинних клітин лінії A375M різними концентраціями сполуки із Прикладу 1, концентрацією сполуки в сироватці через різні проміжки часу та граничною концентрацією для модуляції мішеней, що описано в Прикладі 90.

Детальний опис кращого варіанта здійснення винаходу

Одним з об'єктів даного винаходу є заміщені бензімідазольні похідні формули (I):



(I)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл і гетероарил;

R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл або гало(C_1 - C_6 алкіл);

R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, C_1 - C_6 алкіламінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл і гетероарил;

де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл, гало(C_1 - C_6 алкіл), C_1 - C_6 алкоксигрупу та гало(C_1 - C_6 алкоксигрупу);

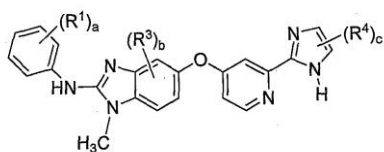
а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

б являє собою 0, 1, 2 або 3; та

с являє собою 1 або 2;

або їх таутмери, стереоізомери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

Іншими варіантами здійснення винаходу є нові заміщені бензімідазольні похідні формули (II):



(II)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл і гетероарил;

R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкіл-

карбоніл, феніл і гетероарил;

де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

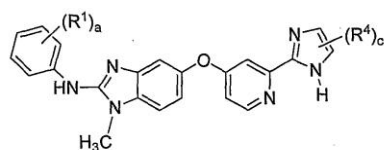
а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

б являє собою 0, 1, 2 або 3; та

с являє собою 1 або 2;

або їх таутмери, стереоізомери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

Іншими варіантами здійснення винаходу є нові заміщені бензімідазольні похідні формули (III):



(III)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, феніл і гетероарил;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл і гетероарил;

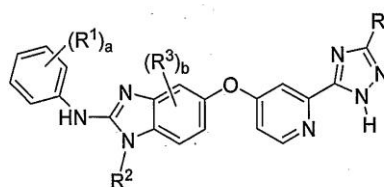
де R^1 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5; та

с являє собою 1 або 2;

або їх таутмери, стереоізомери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

Об'єктами винаходу є також сполуки формули (IV):



(IV)

у якій

R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкілсульфоніл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл-

кіл, феніл і гетероарил;

R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл або гало(C_1 - C_6 алкіл);

R^3 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкоксигрупу, галоген, карбоксил, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, C_1 - C_6 алкіламінокарбоніл, карбонітрил, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкілкарбоніл, феніл і гетероарил;

де R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним або декількома замісниками, незалежно один від іншого вибраними із групи, що включає гідроксигрупу, галоген, C_1 - C_6 алкіл та C_1 - C_6 алкоксигрупу;

а являє собою 1, 2, 3, 4 або 5;

б являє собою 0, 1, 2 або 3;

або їх таутомери, стереоізомери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

Іншими варіантами здійснення винаходу є нові заміщені бензімідазольні похідні формул (I)-(IV), у яких R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає гідроксигрупу, хлор, фтор, бром, метил, етил, пропіл, бутил, метоксигрупу, етоксигрупу, пропоксигрупу, бутоксигрупу, трифторметил, трифторетил, трифторметоксигрупу, трифторетоксигрупу, трифторметилсульфаніл, піперидиніл, C_1 - C_6 алкілпіперидиніл, піперазиніл, C_1 - C_6 алкілпіперазиніл, тетрагідрофураніл, піридиніл, піримідиніл. В інших варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I)-(IV), у яких а являє собою 1 або 2, і щонайменше один R^1 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл), такий як трифторметил. В інших варіантах здійснення винаходу, нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I) і (IV), у яких R^2 являє собою C_1 - C_6 алкіл, такий, наприклад, як метил або етил. В інших варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I), (II) і (IV), у яких б являє собою 0 та, отже, у цьому випадку R^3 відсутній. В альтернативних варіантах здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I)-(IV), у яких б являє собою 1 та R^3 являє собою C_1 - C_6 алкоксигрупу, таку, наприклад, як метоксигрупа. Ще в одному варіанті здійснення винаходу нові заміщені бензімідазольні похідні являють собою сполуки формул (I)-(III), у яких с являє собою 1 або 2 і щонайменше один R^4 являє собою гало(C_1 - C_6 алкіл), такий, наприклад, як трифторметил.

В конкретних варіантах здійснення винаходу R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним-п'ятьма замісниками, незалежно один від іншого вибраними з гідроксигрупи, галогену, C_1 - C_6 алкілу, гало(C_1 - C_6 алкілу), C_1 - C_6 алкоксигрупи та гало C_1 - C_6 алкоксигрупи.

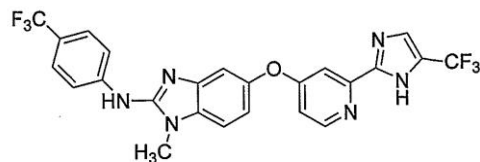
У конкретних варіантах здійснення винаходу

R^1 , R^2 , R^3 та R^4 необов'язково можуть бути заміщені одним-трьома замісниками, незалежно один від іншого вибраними з гідроксигрупи, галогену, C_1 - C_6 алкілу, гало(C_1 - C_6 алкілу), C_1 - C_6 алкоксигрупи та гало C_1 - C_6 алкоксигрупи.

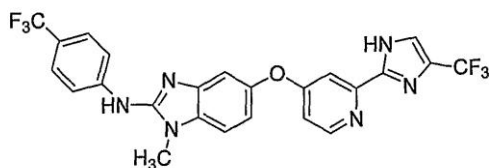
У конкретних варіантах здійснення винаходу R^1 незалежно вибраний із групи, що включає галоген, C_1 - C_6 алкоксигрупу, гало(C_1 - C_6 алкіл), гідроксигрупу, гало C_1 - C_6 алкоксигрупу, гало C_1 - C_6 алкілсульфоніл, гетероарил, гало C_1 - C_6 алкілсульфаніл, гетероциклоалкіл та C_1 - C_6 алкілгетероциклоалкіл. У деяких з таких варіантів здійснення винаходу а являє собою 1 та R^1 незалежно вибраний із групи, що включає 2-хлор, 2-етил, 2-трифторметил, 3-трифторметил, 4-трифторметил, 3-трет-бутил, 4-трет-бутил, 3-етил, 4-етил, 4-хлор, 4-бром, 4-трифторметоксигрупу, 4-трифторметилсульфаніл, 4-трифторметилсульфоніл та 4-(4-метилпіперазиніл). В інших варіантах здійснення винаходу а являє собою 2 та R^1 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає 2-фтор, 2-хлор, 2-гідроксигрупу, 2-метоксигрупу, 3-метоксигрупу, 5-метоксигрупу, 4-хлор, 4-фтор, 3-трифторметил, 4-трифторметил, 5-трифторметил, 5-піридиніл, 5-піридиніл-3-іл, 5-піридиніл-4-іл, 3-тетрагідрофуран-3-іл, 3-ізопропіл, 5-ізопропіл та 5-трет-бутил.

У конкретних варіантах здійснення винаходу R^4 вибраний із групи, що включає C_1 - C_6 алкіл, гідрокси(C_1 - C_6 алкіл), гало(C_1 - C_6 алкіл), гало C_1 - C_6 алкілсульфаніл, C_1 - C_6 алкоксикарбоніл, C_1 - C_6 алкілгетероциклоалкіл, карбонітрил, феніл, гало C_1 - C_6 алкілфеніл, C_1 - C_6 алкілгетероциклоалкілкарбоніл і гідрокси C_1 - C_6 алкіламінокарбоніл. У деяких з таких варіантів здійснення винаходу с являє собою 1 та R^4 вибраний із групи, що включає трифторметил, карбонітрил, феніл, трифторметилсульфаніл, метоксикарбоніл, 4-етилпіперазиніл, 4-етилпіперазиніл-1-карбоніл або 2-гідроксиетиламінокарбоніл. В інших варіантах здійснення винаходу с являє собою 2 та R^4 кожен незалежно один від іншого вибраний із групи, що включає метил, 3-трифторметилфеніл, 4-трифторметилфеніл, трифторметил, етоксикарбоніл, гідроксиметил та феніл.

Іншими варіантами здійснення винаходу є сполука або її фармацевтично прийнятна сіль, де сполука має формулу:



або таутомер сполуки або фармацевтично прийнятна сіль таутомеру формули:



Іншими об'єктами даного винаходу є способи лікування пов'язаних з Raf розладів у людини або тварини, що потребує такого лікування, які полягають у тому, що зазначеному індивідуумові вводять сполуку формули (I), (II), (III) або (IV), у кількості, що має ефективність відносно зниження або попередження росту пухлини в індивідуума.

Іншими об'єктами даного винаходу є способи лікування пов'язаних з Raf захворювань у людини або тварини, що потребує такого лікування, що полягають у тому, що індивідуумові вводять сполуку формули (I), (II), (III) або (IV), у кількості, що має ефективність відносно зниження або попередження росту пухлини в індивідуума, у поєднанні щонайменше з одним додатковим агентом, призначеним для лікування раку.

Наступними об'єктами даного винаходу є способи лікування пов'язаних з Raf розладів у людини або тварини, що потребує такого лікування, що полягають у тому, що зазначеному індивідуумові вводять сполуку формули (I), (II), (III) або (IV), у кількості, що має ефективність відносно зниження або попередження росту пухлини в індивідуума, у поєднанні щонайменше з одним додатковим агентом, призначеним для лікування раку. Ряд прийнятних протиракових агентів, які можна застосовувати для спільної терапії, можна використовувати в способах, запропонованих у даному винаході. Отже, згідно із даним винаходом можна застосовувати кілька протиракових агентів, таких як (але не обмежуючись ними): агенти, які індукують апоптоз; полінуклеотиди (наприклад, рибозими); поліпептиди (наприклад, ферменти); лікарські засоби; біологічні міметики; алкалоїди; алкілюючі агенти; протипухлинні антибіотики; антиметаболіти; гормони; сполуки платини; моноклональні антитіла, кон'юговані із протираковими лікарськими засобами, токсини та/або радіонукліди; модифікатори біологічної відповіді (наприклад, інтерферони [наприклад, IFN- α тощо] та інтерлейкіни [наприклад, IL-2 тощо] і т.д.); агенти для адоптивної імунотерапії; гематопоетичні фактори росту; агенти, які індукують диференціювання пухлинних клітин (наприклад, повністю-транс-ретиноева кислота і т.д.); реагенти для генної терапії; реагенти та нуклеотиди для антисмислової терапії; протипухлинні вакцини; інгібітори ангиогенезу тощо. Деякі інші приклади хіміотерапевтичних сполук та протиракових терапій, які можна застосовувати разом з описаними сполуками формули (I), (II), (III) або (IV), відомі фахівцям у даній галузі техніки.

У кращих варіантах здійснення винаходу протиракові агенти, які можна застосовувати в поєднанні зі сполуками, запропонованими в даному винаході, являють собою агенти, які індукують або стимулюють апоптоз. До агентів, які індукують апоптоз, відносяться (але не обмежуючись ними) радіація; інгібітори кіназ (наприклад, інгібітор кіна-

зного рецептора епідермального фактору росту [EGFR], інгібітор кіназного рецептору судинного фактору росту [VGFR], інгібітор кіназного рецептору фактору росту фібробластів [FGFR], інгібітор кіназного рецептору тромбоцитарного фактору росту [PGFR] та інгібітори кіназ Bcr-Abl, такі як STI-571, глевек (Gleevec) і глівек (Glivec)]; антисмислові молекули; антитіла [наприклад, херцептин (Herceptin) і ритуксан (Rituxan)]; антиестрогени [наприклад, ралоксифен і тамоксифен]; антиандрогени [наприклад, флутамід, бікалутамід, фінастерид, аміноглутетамід, кетоконазол і кортикостероїди]; інгібітори циклооксигенази 2 (COX-2) [наприклад, целекоксиб (Celecoxib), мелоксикам, NS-398 і нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НСПЗЗ)]; і протиракові хіміотерапевтичні лікарські засоби [наприклад, іринотекан (Camptosar), CPT-11, флударабін (Fludara), дакарбазин (DTIC), дексаметазон, мітоксантрон, мілотарг (Mylotarg), VP-16, цисплатина, 5-ФУ, доксирубіцин, таксотер або таксол]; молекули, що беруть участь у передачі сигналів у клітині; кераміди та цитокіни; і стауросприн тощо.

Іншими об'єктами даного винаходу є фармацевтичні композиції, що містять щонайменше одну сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль формули (I), (II), (III) або (IV) у поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм, які можна застосовувати для введення людині або тварині, або окремо, або в поєднанні з іншими протираковими агентами.

Наступними об'єктами даного винаходу є способи одержання сполук формул (I), (II), (III) або (IV), представлених у даному описі.

Іншими об'єктами даного винаходу є сполуки, що являють собою інгібітори ферменту Raf-кінази. Оскільки фермент являє собою розташований по ходу шляху передачі сигналу ефектор p21^{ras}, інгібітори, запропоновані в даному винаході, застосовують у фармацевтичних композиціях, призначених для медицини або ветеринарії, у випадках, коли показано інгібування шляху кінази Raf наприклад, для лікування пухлин та/або росту ракових клітин, опосередкованого кіназою Raf. Зокрема, сполуки можна застосовувати для лікування раку у людини або тварини, наприклад, раку миші, оскільки розвинення цих типів раку залежить від каскаду сигнальної трансдукції білку Ras, і тому вони чутливі до лікування шляхом переривання цього каскаду за допомогою інгібування активності кінази Raf. Таким чином, сполуки, запропоновані у винаході, можна застосовувати для лікування солідних пухлин таких, наприклад, як саркоми (наприклад, рак легені, підшлункової залози, щитовидної залози, яєчника, сечового міхура, молочної залози, передміхурової залози або товстої кишки), меланоми, мієлоїдні розлади (наприклад, мієлолейкоз, множинна мієлома та еритролейкоз), аденоми (наприклад, ворсинчаста пухлина товстої кишки) і саркоми (наприклад, остеосаркома).

У контексті даного опису поняття «інгібітор Raf» відноситься до сполуки, у якій значення IC₅₀, що характеризує активність у відношенні кінази Raf, не перевищує приблизно 100 мкМ та, як правило, не перевищує приблизно 50 мкМ, при оцінці за допомогою аналізу з використанням фільтрації

Raf/Mek, що описаний у цілому нижче. Кращими ізоформами кінази Raf, які інгібують сполуки, запропоновані в даному винаході, є A-Raf, B-Raf та C-Raf (Raf-1). Поняття «IC₅₀» являє собою концентрацію інгібітору, що знижує активність ферменту (наприклад, кінази Raf) наполовину від максимального рівня. Встановлено, що репрезентативні сполуки, запропоновані в даному винаході, мають інгібуючу активність по відношенню до Raf. Сполуки, запропоновані в даному винаході, переважно характеризуються значенням IC₅₀ у відношенні Raf, що не перевищує приблизно 10 мкМ, більш переважно не перевищує приблизно 5 мкМ, ще більш переважно не перевищує приблизно 1 мкМ і найбільш переважно не перевищує приблизно 200 нМ, при оцінці кіназної активності Raf за допомогою аналізів, зазначених у даному описі.

У контексті даного опису поняття «шлях сигнальної трансдукції MAPK» є скороченим позначенням шляху сигнальної трансдукції мітоген-активованої протеїнкінази в модулі, що складається з молекул Ras-Raf-MEK-ERK, що передають сигнал.

Поняття «алкіл» відноситься до насичених вуглеводневих груп, які не містять гетероатомів, і воно включає алкільні групи із прямим ланцюгом, такі як метил, етил, пропіл, бутіл, пентил, гексил, гептил, пропіл, ноніл, децил, ундецил, додецил тощо. Поняття «алкіл» відноситься також до ізомерів прямоланцюгових алкільних груп з розгалуженим ланцюгом, включаючи (але не обмежуючись ними) наступні, наведені як приклад групи: -CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH(CH₂CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -C(CH₂CH₃)₃, CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂CH(CH₂CH₃)₂, -CH₂C(CH₃)₃, -CH₂C(CH₂CH₃)₃, -CH(CH₃)CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₂CH(CH₂CH₃)₂, -CH₂CH₂C(CH₃)₃, -CH₂CH₂C(CH₂CH₃)₃, -CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH(CH₃)CH(CH₃)₂, H(CH₂CH₃)CH(CH₃)CH(CH₃)(CH₂CH₃) та ін. Отже, алкільні групи включають первинні, вторинні та третинні алкільні групи. Поняття «C₁-C₁₂алкіл» відноситься до алкільних груп, що мають від одного до дванадцяти атомів вуглецю. Поняття «C₁-C₆алкіл» відноситься до алкільних груп, що мають від одного до шести атомів вуглецю.

Поняття «алкеніл» відноситься до вуглеводневих груп із прямим або розгалуженим ланцюгом, що має від 2 до 6 атомів вуглецю та переважно від 1 до 2 ненасичених вінільних зв'язків (>C=C<). Прикладами таких груп можуть служити вініл, аліл і бут-3-ен-1-іл. Це поняття включає цис- і транс-ізомери або суміші таких ізомерів.

Поняття «алкоксигрупа» відноситься до групи RO-, у якій R являє собою алкіл. У контексті даного опису поняття «C₁-C₆алкоксигрупа» відноситься до групи RO-, у якій R являє собою C₁-C₆алкіл. Типовими прикладами C₁-C₆алкоксигруп є метоксигрупа, етоксигрупа, трет-бутоксигрупа і т.п.

Поняття «C₁-C₆алкоксикарбоніл» відноситься до складного ефіру -C(=O)-OR, у якому R являє собою C₁-C₆алкіл.

Поняття «амідиногрупа» відноситься до групи -C(=NH)NH₂. Поняття «амідин» відноситься до

сполуки, що містить таку групу.

У контексті даного опису поняття «амінокарбоніл» відноситься до групи -C(O)-NH₂.

Поняття «C₁-C₆алкіламінокарбоніл» відноситься до групи -C(O)-NRR', у якій R являє собою C₁-C₆алкіл та R' вибраний з водню та C₁-C₆алкілу.

Поняття «карбоніл» відноситься до двовалентної групи -C(O)-.

Поняття «карбоксил» відноситься до групи -C(=O)-OH.

Поняття «ціаногрупа», «карбонітрил» або «нітрил» відносяться до групи -CN.

Поняття «карбонітрилC₁-C₆алкіл» відноситься до C₁-C₆алкілу, заміщеному -CN.

Поняття «циклоалкіл» відноситься до моно- або поліциклічного алкільного замісника. Як правило, циклоалкільні групи мають від 3 до 8 кільцевих атомів вуглецю. Типовими циклоалкільними групами є циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил і циклооктил.

Поняття «галоген» або «гало» позначають хлор, бром, фтор та йод.

Поняття «галоC₁-C₆алкіл» відноситься до C₁-C₆алкільного радикалу, заміщеного одним або декількома атомами галогену, переважно одним-п'ятьма атомами галогену. Кращої галоC₁-C₆алкільною групою є трифторметил.

Поняття «галоC₁-C₆алкілфеніл» відноситься до фенільної групи, заміщеної галоC₁-C₆алкільною групою.

Поняття «галоC₁-C₆алкокси група» відноситься до алкоксигрупи, заміщеної одним або декількома атомами галогену, переважно одним-п'ятьма атомами галогену. Кращої галоC₁-C₆алкокси групою є трифторметоксигрупа.

Поняття «галоC₁-C₆алкілсульфоніл» та «галоC₁-C₆алкілсульфаніл» відносяться до заміщення сульфонільної та сульфанільної груп галоC₁-C₆алкільними групами, де сульфоніл і сульфаніл мають значення, зазначені в даному описі.

Поняття «гетероарил» відноситься до ароматичної групи, що має від 1 до 4 гетероатомів як кільцеві атоми в ароматичному кільці, і де інші кільцеві атоми являють собою атоми вуглецю. Придатними гетероатомами, які можна застосовувати в сполуках, запропонованих у даному винаході, є азот, кисень та сірка, причому атоми азоту та сірки необов'язково можуть бути окислені. Прикладами гетероарильних груп є групи, що мають від 5 до 14 кільцевих атомів, і вони включають, наприклад, бензімідазоліл, бензтіазоліл, бензоксазоліл, діазепініл, фураніл, піразиніл, піразоліл, піридил, піридазиніл, піримідиніл, піроїл, оксазоліл, ізоксазоліл, імідазоліл, індоліл, індазоліл, хінолініл, ізохінолініл, хіназолініл, хіноксалініл, тіазоліл, тієніл і триазоліл.

У контексті даного опису поняття «гетероциклоалкіл» відноситься до циклоалкільних замісників, які мають від 1 до 5, і, як правило, від 1 до 2 гетероатомів у кільцевій структурі. Придатними гетероатомами, які можна застосовувати в сполуках, запропонованих у даному винаході, є азот, кисень і сірка, причому атоми азоту та сірки необов'язково можуть бути окислені. Типові гетероциклоалкільні радикали включають, наприклад,

морфоліногрупу, піперазиніл, піперидиніл, тощо.

Поняття «С₁-С₆алкілгетероциклоалкіл» відноситься до гетероциклоалкільної групи, заміщеної С₁-С₆алкільною групою.

Поняття «гетероциклоалкілС₁-С₆алкіл» відноситься до С₁-С₆алкілу, заміщеному гетероциклоалкілом.

Поняття «гетероциклоалкілкарбоніл» відноситься до групи -C(O)-R¹⁰, у якій R¹⁰ являє собою гетероциклоалкіл.

Поняття «С₁-С₆алкілгетероциклоалкілкарбоніл» відноситься до групи C(O)-R¹¹, у якій R¹¹ являє собою С₁-С₆алкілгетероциклоалкіл.

Поняття «гідроксигрупа» відноситься до групи -ОН.

Поняття «гідроксиС₁-С₆алкіл» відноситься до С₁-С₆алкільної групи, заміщеної гідроксигрупою.

Поняття «гідроксиС₁-С₆алкіламінокарбоніл» відноситься до С₁-С₆алкіламіно-карбонільної групи, заміщеної гідроксигрупою.

Поняття «імідат» або «складний ефір імідату» відноситься до групи -C(=NH)O- або до сполуки, що містить таку групу. Складні ефіри імідату включають, наприклад, складний метиловий ефір імідату -C(=NH)OCH₃.

Поняття «нітрогрупа» відноситься до групи -NO₂.

У контексті даного опису поняття «сульфоніл» відноситься до групи -SO₂-.

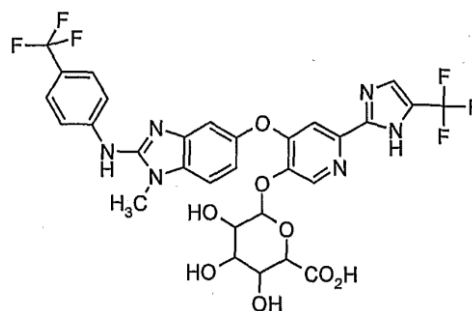
У контексті даного опису поняття «сульфаніл» відноситься до групи -S-. Поняття «алкілсульфоніл» відноситься до заміщеного сульфону, що має структуру -SO₂R¹², у якій R¹² являє собою алкіл. Поняття «алкілсульфаніл» відноситься до заміщеного сульфанілу, що має структуру -SR¹², у якій R¹² являє собою алкіл. Алкілсульфонільні та алкілсульфанільні групи, застосовувані в сполуках, запропонованих у даному винаході, включають С₁-С₆алкілсульфоніл та С₁-С₆алкілсульфаніл. Отже, типові групи включають, наприклад, метилсульфоніл та метилсульфаніл (тобто, групи, у яких R¹² являє собою метил), етилсульфоніл та етилсульфаніл (тобто, групи, у яких R¹² являє собою етил), пропілсульфоніл і пропілсульфаніл (тобто, групи, у яких R¹² являє собою пропіл) тощо.

Поняття «гідрокси-захисна група» відноситься до захисних груп для групи ОН. У контексті даного опису поняття відноситься також до захисту групи ОН кислоти COOH. Придатні гідрокси-захисні групи, а також придатні умови для захисту та видалення захисту конкретних функціональних груп добре відомі в даній галузі. Наприклад, численні такі захисні групи описані в Т. W. Greene та Р. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3-й вид., Wiley, New York, 1999. Такі захисні групи являють собою складні С₁-С₆алкілові ефіри, складні бензилові ефіри, складні пара-метоксибензилові ефіри тощо.

Поняття «поліморф» відноситься до різних кристалічних форм сполуки. Поліморфи можуть відрізнятися один від іншого різними фізичними властивостями, такими, наприклад, як розходження їх рентенограм, картин абсорбційної ІЧ-спектроскопії, температур плавлення, стабільності

або розчинності.

Поняття «метаболіт» відноситься до будь-якої похідної, що утворюється в організмі індивідуума після введення материнської сполуки. Похідні можуть утворюватися з материнської сполуки в результаті різних біохімічних перетворень в організмі індивідуума, таких, наприклад, як окислювання, відновлення, гідроліз або кон'югація, і вони включають, наприклад, оксиди та деметильовані похідні. Метаболіти, що відповідають таким похідним, можна одержувати також за допомогою методів *in vitro* або за допомогою методів синтезу. У конкретних варіантах здійснення винаходу метаболіт сполуки формули (I)-(IV) являє собою оксид. У деяких об'єктах оксид являє собою N-оксид, отриманий синтезом шляхом обробки сполуки формули (I)-(IV) окислювачем. У конкретних об'єктах винаходу окислювач являє собою N-оксид N-метилморфоліну або гідропероксид, такий як перекис водню. У деяких варіантах здійснення винаходу сполуку формули (I)-(IV) піддають кон'югації із глюкуроновою кислотою з утворенням метаболіту. Іншим об'єктом винаходу є метаболіт, його таутомер або стереоізомер, що має структуру:



Поняття «необов'язково заміщений» або «заміщений» відноситься до заміщення одного або декількох атомів водню одновалентним або двовалентним радикалом.

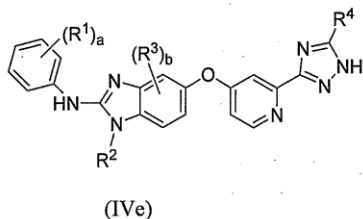
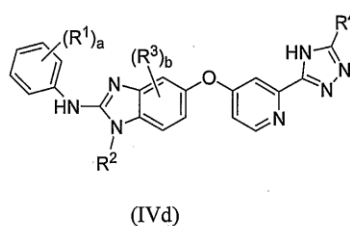
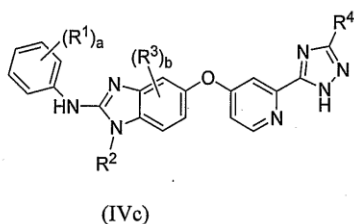
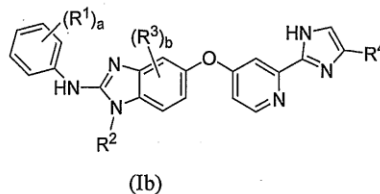
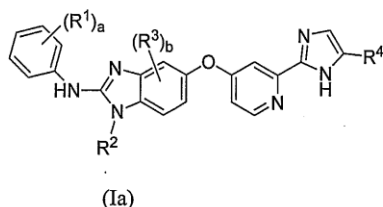
Коли заміщений замісник включає групу із прямим ланцюгом, то заміщення може мати місце всередині ланцюга (прикладом є 2-гідроксипропіл, 2-амінобутил тощо) або на кінці ланцюга (прикладом є 2-гідроксиетил, 3-ціанпропіл тощо). Заміщені замісники можуть мати прямоланцюгові, розгалужені або циклічні конфігурації ковалентно зв'язаних атомів вуглецю або гетероатомів.

Мається на увазі, що наведені вище визначення не включають неприпустимі схеми заміщення (наприклад, метил, заміщений п'ятьма атомами фтору, або атом галогену, заміщений іншим атомом галогену). Такі неприпустимі схеми заміщення добре відомі фахівцям в даній області.

Фахівцям у даній області повинно бути також очевидно, що сполуки, запропоновані у винаході, включаючи сполуки формул (I), (II), (III) або (IV) або їх стереоізомери та поліморфи, а також фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри, метаболіти та проліки кожної із цих сполук, можна піддавати таутомеризації, і отже вони можуть існувати в різних таутомерних формах, у яких протон одного атому молекули зміщується на інший атом та внаслідок цього перетворюються хімічні

зв'язки між атомами молекул (див., наприклад, March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structures*, 4-й вид., John Wiley & Sons, 1992, стор. 69-74). У контексті даного опису поняття «таутомер» відноситься до сполук, що утворюються в результаті зсуву протона, і мається на увазі, що всі таутомерні форми, якщо вони мо-

жуть існувати, попадають в обсяг винаходу. Наприклад, таутомер сполуки наведеної нижче формули (Ia), що є сполукою формули (I), у якій є являє собою 1, являє собою сполуку формули (Ib). Аналогічно цьому таутомер сполуки формули (IVc) являє собою сполуку формули (IVd) або (IVe).



Сполуки, запропоновані у винаході, включаючи сполуки формул (I), (II), (III) або (IV) або їх таутомери та поліморфи, а також фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри, метаболіти та проліки кожної із цих сполук можуть містити асиметрично заміщені атоми вуглецю. Наявність таких асиметрично заміщених атомів вуглецю може приводити до утворення сполук, запропонованих у винаході, у формі енантіомерів, діастереоізомерів та інших стереоізомерів, які в поняттях абсолютної стереохімії можна позначати як (R)- або (S)-форми. Таким чином, всі такі можливі ізомери, індивідуальні стереоізомери в їх оптично чистих формах, їх суміші, рацемічні суміші (або «рацемати»), суміші діастереоізомерів, а також індивідуальні діастереоізомери сполук, запропонованих у винаході, попадають в обсяг даного винаходу. У контексті даного опису поняття «S»- і «R»-конфігурація мають значення, визначені у IUPAC 1974 RECOMMENDATIONS FOR SECTION E, FUNDAMENTAL STEREOCHEMISTRY, Pure Appl. Chem. 45, 1976, стор. 13-30. Поняття α та β використовують для позначення положень кілець циклічних сполук. α -сторона розглянутої площини являє собою сторону, на якій кращий замісник перебуває в положенні з найменшим номером. Замісником, що перебувають із протилежної сторони розглянутої площини, привласнюється ідентифікатор β . Слід зазначити, що таке вживання відрізняється від того, яке використовують для циклічних

стереопартнерів, у яких « α » означає «що знаходиться нижче площини» і являє собою абсолютну конфігурацію. У контексті даного опису поняття α - та β -конфігурація мають значення, визначені в CHEMICAL ABSTRACTS INDEX GUIDE, Додаток IV, 1987, параграф 203.

Фахівцям у даній області повинно бути також очевидно, що сполуки, запропоновані у винаході, включаючи сполуки формул (I), (II), (III) або (IV), або їх стереоізомери та таутомери, а також фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри, метаболіти та проліки кожної із цих сполук, можуть існувати в різних кристалічних формах (або «поліморфах»), що мають різні фізичні властивості. Мається на увазі, що всі поліморфи сполук, запропонованих у винаході, включаючи їх метаболіти, проліки, стереоізомери та таутомери, а також фармацевтично прийнятні солі кожної із цих сполук, якщо вони можуть існувати, як у виділеній формі, так і у вигляді суміші, попадають у обсяг винаходу.

У контексті даного опису поняття «фармацевтично прийнятні солі» відноситься до нетоксичних солей кислот або лужноземельних металів сполуки, таутомеру, стереоізомеру, поліморфу, складного ефіру, метаболіту, або проліків формул (I), (II), (III) або (IV). Ці солі можна одержувати *in situ* у процесі кінцевого виділення та очищення сполук формул (I), (II), (III) або (IV), або окремо, здійснюючи взаємодію основної або кислотної функції із

придатною органічною або неорганічною кислотою або основою відповідно. Типовими солями є (але не обмежуючись ними) наступні солі: ацетат, адипат, альгінат, цитрат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бісульфат, бутират, камфорат, камфорульфат, диглюконат, циклопентанпропіонат, додецилсульфат, етансульфонат, глюкогептаноат, гліцерофосфат, гемісульфат, гептаноат, гексаноат, фумарат, гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, 2-гідроксипентансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, нікотинат, 2-нафталінсульфонат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенілпропіонат, пікрат, півалат, пропіонат, сукцинат, сульфат, тарtrat, тиоціанат, паратолуолсульфонат та ундеканоат. Основні азотомісні групи можна також кватернізувати за допомогою таких агентів, як (нижч.) алкілгалогеніди, такі як метил-, етил-, пропіл- і бутилхлориди, -броміди та -йодиди; діалкілсульфати, такі як диметил-, діетил-, дибутил- і діамилсульфати, галогеніди з довгим ланцюгом, такі як децил-, лаурил-, міристил- і стеарилхлориди, -броміди, та -йодиди, фенілалкілгалогеніди, такі як бензил- і фенетилброміди та інші. При цьому одержують розчинні продукти або продукти, що диспергуються у воді або маслі.

Прикладами кислот, які можна використовувати для одержання фармацевтично прийнятних кислотно-адитивних солей, є такі неорганічні кислоти, як соляна кислота, сірчана кислота та фосфорна кислота, і такі органічні кислоти, як щавлева кислота, малеїнова кислота, метансульфонова кислота, бурштинова кислота та лимонна кислота. Солі приєднання основ можна одержувати *in situ* у процесі кінцевого виділення або очищення сполук формули (I) або окремо, піддаючи взаємодії фрагменти карбонової кислоти із придатною основою, таким як гідроксид, карбонат або бікарбонат фармацевтично прийнятного катіона металу, або з аміаком, або з органічним первинним, вторинним або третинним аміном. Фармацевтично прийнятні солі включають (але не обмежуючись ними) катіони лужних або лужноземельних металів, такі як натрієві, літєві, калієві, кальцієві, магнієві, алюмінієві солі та т.п., а також нетоксичні катіони амонію, четвертинного амонію та аміну, включаючи (але не обмежуючись ними) амоній, тетраметиламоній, тетраетиламоній, метиламін, диметиламін, триметиламін, триетиламін, етиламін, тощо. Інші типові органічні аміни, які можна застосовувати для одержання солей приєднання основ, включають діетиламін, етилендіамін, етаноламін, діетаноламін, піперазин, тощо.

Солі та препарати сполук, запропонованих у винаході, описані також у попередніх заявках, названих «Formulations For Benzimidazole Pyridyl Ethers» (US серійний номер 60/832715; досьє у патентного повіреного номер PP028237.0001), зареєстрований 21 липня 2006 року, і «Salts of Benzimidazolyl Pyridyl Ethers and Formulations Thereof» (досьє у патентного повіреного номер PP028258.0001), зареєстрований 30 серпня 2006 року, кожна з яких повністю включена в даний опис як посилання.

У контексті даного опису поняття «фармацевтично прийнятний складний ефір» відноситься до

складних ефірів, які гідролізуються *in vivo*, і включає складні ефіри, які легко розщеплюються в людському організмі з вивільненням материнської сполуки або її солі. Придатними складноєфірними групами є, наприклад, групи, отримані з фармацевтично прийнятних аліфатичних карбонових кислот, насамперед алканових, алкенових, циклоалканових та алкандіонових кислот, у яких кожен алкільний або алкенільний фрагмент переважно має не більше 6 атомів вуглецю. Прикладами конкретних складних ефірів є форміати, ацетати, пропіонати, бутирати, акрилати та етилсукцинати.

У контексті даного опису поняття «фармацевтично прийнятні проліки» відноситься до таких проліків сполук, запропонованих у даному винаході, які з медичної точки зору придатні для контакту із тканинами людини та нижчих тварин і не викликають надмірну токсичність, подразнення, алергійні реакції та т.п., характеризуються прийнятним співвідношенням сприятливої дії/ризиків та мають ефективність відносно мети їх застосування, а також до цвіттеріонних форм, якщо вони існують, сполук, запропонованих у винаході. Поняття «проліки» відноситься до сполук, які швидко трансформуються *in vivo*, вивільняючи материнську сполуку зазначеної вище формули, наприклад, у результаті гідролізу в крові. Докладне обговорення цього питання дане в T. Higuchi та V. Stella, *Prodrugs as Novel Delivery Systems*, том 14 A.C.S. Symposium Series, та у *Bioreversible Carriers in Drug Design*, під ред. Edward B. Roche, з American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, обидві публікації включені в даний опис як посилання.

Фахівцям у даній області повинно бути очевидно, що сполуки, запропоновані у винаході, включаючи сполуки формул (I), (II), (III) або (IV), або їх таутомери, проліки, стереоізомери та поліморфи, а також фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри та проліки будь-яких їх цих сполук можуть піддаватися процесингу *in vivo* у результаті метаболізму в організмі або клітині людини або тварини з утворенням фармацевтично активних метаболітів, які зберігають свою активність як інгібітори. Активні метаболіти сполуки, запропонованої у винаході, можна ідентифікувати за допомогою стандартних методів, відомих у даній області (див., наприклад, Bertolini G. і ін., *J. Med. Chem.* 40, 1997, стор. 2011-2016; Shan D. і ін., *J. Pharm. Sci.* 86(7), стор. 765-767; Bagshawe K., *Drug Dev. Res.* 34, 1995, стор. 220-230; Bodor N., *Advances in Drug Res.* 73, 1984, стор. 224-331; Bundgaard H., *Design of Prodrugs*, з Elsevier Press, 1985; і Larsen I. K., *Design and Application of Prodrugs, Drug Design and Development*, під ред. Krogsgaard-Larsen та ін., з Harwood Academic Publishers, 1991). Мається на увазі, що індивідуальні хімічні сполуки, які є активними метаболітами сполуки, запропонованої у винаході, попадають у обсяг винаходу.

Поняття «рак» відноситься до ракового захворювання, на яке можна робити сприятливу лікувальну дію шляхом інгібування кінази, насамперед кінази Raf, і воно включає, наприклад, типи раку, що характеризуються солідними пухлинами, такими, наприклад, як карциноми (наприклад, рак ле-

гені, підшлункової залози, щитовидної залози, яєчника, сечового міхура, молочної залози, передміхурової залози або товстої кишки), меланоми, мієлоїдні розлади (наприклад, мієлоїдний лейкоз, множинна мієлома та еритролейкоз), аденоми (наприклад, ворсинчаста пухлина товстої кишки) і саркоми (наприклад, остеосаркома).

У типових варіантах здійснення винаходу сполуки, запропоновані у винаході, являють собою, наприклад, такі як:

{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін,
 (2-фтор-5-піридин-3-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-піридин-4-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(3-трифторметилфеніл)амін,
 (3-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-хлор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-фтор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметоксифеніл)амін,
 (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-(3-трифторметилфеніл)-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-(4-трифторметилфеніл)-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 етиловий ефір 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1Н-імідазол-4-карбонової кислоти,
 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1Н-імідазол-4-іл}метанол,
 2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3Н-імідазол-4-карбонітрил,
 (3-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-феніл-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 {1-метил-5-[2-(5-феніл-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметилсульфанілфеніл)амін,

(3-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,

[4-фтор-3-(тетрагідрофуран-3-іл)феніл]-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-бромфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-фтор-3-ізопропілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(4-трифторметилсульфанілфеніл)амін,
 (2-фтор-5-ізопропілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (5-трет-бутил-2-фторфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-піридин-3-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3Н-імідазол-4-карбонітрил,
 (2-хлор-4-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (5-трет-бутил-2-хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-піридин-4-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-хлор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 {1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}-(3-трифторметилфеніл)амін,
 (3-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-хлор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл}амін,
 (2-хлор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-

ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 (4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 {1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)-(3-трифторметилфеніл)амін,
 (5-трет-бутил-2-фторфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 [4-(4-метилпіперазин-1-іл)феніл]-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 метиловий ефір 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3Н-імідазол-4-карбонової кислоти,
 етиловий ефір 2-{4-[2-(2-хлор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1Н-імідазол-4-карбонової кислоти,
 (2-фтор-4-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 (2-хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 (2,5-диметоксифеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 (3,5-диметоксифеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)-(2-трифторметилфеніл)амін,
 (2-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 (4-етилпіперазин-1-іл)-(2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3Н-імідазол-4-іл)метанон,
 (2-гідроксиетил)амід 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3Н-імідазол-4-карбонової кислоти,
 {1-етил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)-(2-фтор-5-трифторметилфеніл)амін,
 (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{6-метокси-1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)амін,
 {6-метокси-1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)-(4-трифторметилфеніл)амін,
 (4-етилпіперазин-1-іл)-(2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3Н-імідазол-4-іл)метанон,
 {1-етил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іл)-(4-трифторметилфеніл)амін,
 (2-гідроксиетил)амід 2-{4-[1-метил-2-(4-

трифторметилфеніламіно)-1Н-бензоімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3Н-імідазол-4-карбонової кислоти,

2-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іламіно}-5-трифторметилфенол та

3-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензоімідазол-2-іламіно}-6-трифторметилфенол;

або їх таутомери, стереоізомери, поліморфи, складні ефіри, метаболіти або проліки або фармацевтично прийнятні солі сполук, таутомерів, стереоізомерів, поліморфів, складних ефірів, метаболітів або проліків.

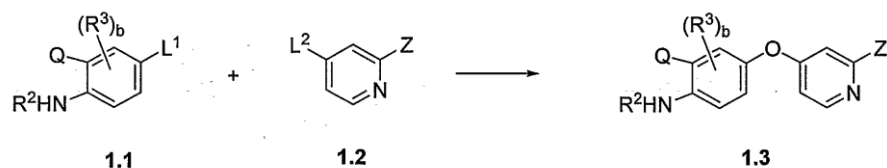
Іншими об'єктами даного винаходу є способи одержання сполук формул (I), (II), (III) або (IV) і синтетичні проміжні продукти, які можна застосовувати в таких способах.

Даний винахід відноситься також до способів одержання сполук, запропонованих у винаході, і до синтетичних проміжних продуктів, які можна застосовувати в таких способах, як це докладно описано нижче.

Способи синтезу

На схемі 1 проілюстрований синтез центрального фрагменту, що являє собою простий біариловий ефір, сполук, запропонованих у винаході. Сполуку 1.1 піддають взаємодії зі сполукою 1.2, де один з радикалів L^1 або L^2 являє собою галоген, а інший з радикалів L^1 або L^2 являє собою OH, з одержанням простого ефіру 1.3. Сполучення можна здійснювати в органічному розчиннику, такому як ацетонітрил або диметилсульфоксид, у присутності основи, і можна здійснювати також при підвищених температурах або температурах дефлегмації. Придатними основами є K_2CO_3 , $CaCO_3$, KOH, NaOH або $KF \cdot Al_2O_3$ (Journal of Organic Chemistry, том 63, No. 18, 1998, стор. 6338-6343). Група Q у сполуці 1.1 може являти собою NH_2 або попередник аміногрупи, такий як NO_2 , або захищену аміногрупу, яку можна потім перетворювати в аміногрупу шляхом відновлення або видалення захисних груп з попередників аміногрупи, відповідно. Група Z у сполуці 1.2 може являти собою імідазолільну групу, заміщену однією або двома групами R^4 , або функціональну групу, яку можна використовувати для формування такої імідазолільної групи. Придатними функціональними групами є альдегід або попередник альдегіду, такий як складний ефір або карбонітрил, що потім можна перетворювати в альдегід. Складноефірні та карбонітрильні групи можна відновлювати до альдегіду за допомогою відновнику, такого як гібрид дізобутилалюмінію. Z може являти собою також групу $-CH_2OR^5$, у якій R^5 являє собою гідроксизахисну групу. Альдегід можна одержувати на більш пізній стадії шляхом видалення захисної групи із групи R^5 та окислювання спирту, що утворився, до альдегіду. Перетворення альдегіду в заміщену імідазолільну групу проілюстровано на схемі 3. Інші методи формування заміщеної імідазолільної групи проілюстровані на схемі 6.

Схема 1:

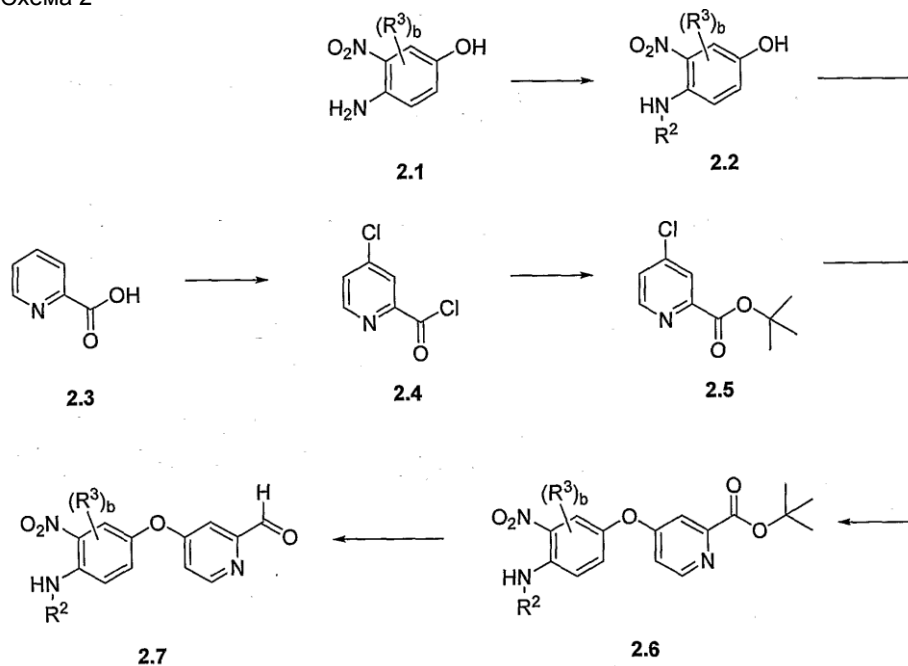


На схемі 2 представлений приклад синтезу конкретних простих біарильних ефірів. Слід мати на увазі, що представлені на схемі 2 схеми заміщення, наведені як приклад: Q являє собою NO_2 , L^1 являє собою OH , L^2 являє собою Cl та Z являє собою складний трет-бутиловий ефір. Приклад синтезу альдегіду **2.7**, у якому R^2 являє собою метил та b являє собою O , представлений у прикладі 1. Амін **2.1** можна перетворювати в алкіламін **2.2** за допомогою численних відомих методів. В одному з варіантів амін **2.1** обробляють оцтовим ангідридом і мурашиною кислотою з одержанням відповідного формаміду, який можна відновлювати до алкіламіну **2.2**. Придатними відновниками є $NaBH_4$ у присутності $BF_3(OCH_2CH_3)_2$. В альтернативному варіанті алкіламін **2.2** можна синтезувати шляхом взаємодії

аміну **2.1** із трифтороцтовим ангідридом, алкілювання відповідного аміду за допомогою алкілюючого агенту, такого як алкілгалогенід, і видалення трифторацетамідозахисної групи шляхом обробки основою, такою як $NaOH$.

Хлорид **2.5** можна одержувати шляхом обробки піколінової кислоти **2.3** надлишком тіонілхлориду з одержанням хлорангіриду **2.4**, що потім обробляють ди-трет-бутилдикарбонатом і піридином з одержанням хлориду **2.5**. Шляхом сполучення спирту алкіламіну **2.2** із хлоридом **2.5** в основних умовах одержують простий ефір **2.6**, який потім можна перетворювати безпосередньо в альдегід **2.7** шляхом відновлення за допомогою гідриду діізобутилалюмінію або у дві стадії шляхом відновлення складного ефіру **2.6** до спирту та наступного окислювання до альдегіду.

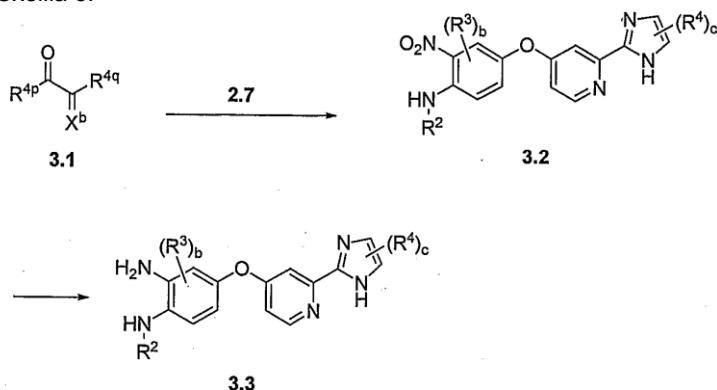
Схема 2



На схемі 3 проілюстровано створення імідазольного кільця. Альдегід **2.7** можна піддавати взаємодії зі сполукою **3.1**, у якій X^b являє собою $=O$ або $=NHOH$ та R^{4p} та R^{4q} незалежно один від іншого позначають H або R^4 , де R^4 приймає зазначені вище значення, за умови, що принаймні один з R^{4p} та R^{4q} являє собою R^4 . Реакцію можна

здійснювати в полярному розчиннику, такому як суміш етилацетат/етанол, та в присутності NH_4OH з одержанням сполуки **3.2**. Нітрогрупу сполуки **3.2** можна відновлювати до аміногрупи **3.3** шляхом обробки відновником, таким як дитіоніт натрію ($Na_2S_2O_4$).

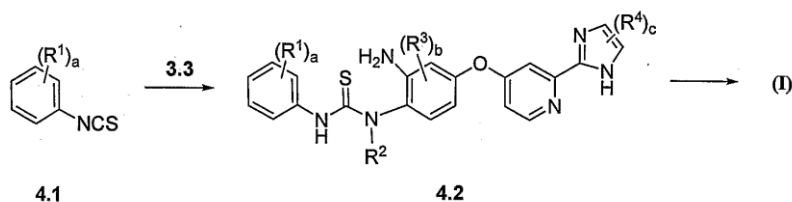
Схема 3:



На схемі 4 проілюстроване створення бензімідазольного кільця. Діамін 3.3 піддають взаємодії з тіоізоціанатом 4.1, одержуючи тіосечовину 4.2. Шляхом обробки сполуки 4.2 десульфуруючим агентом одержують сполуку формули (I). Поняття «десульфуруючий агент» відноситься до агентів, які можна застосовувати для здійснення

замикання кільця, таких як $FeCl_3$, йодид 2-хлор-1-метилпіридинію (реагент Мукайямі), хлорид 2-хлор-1,3-диметилімідазолію, $POCl_3$, або алкілгалогенід, такий як метилйодид. Можна використовувати також модифіковані реагенти Мукайямі (Journal of Organic Chemistry, том 70, No. 7, 2005, стор. 2835-2838).

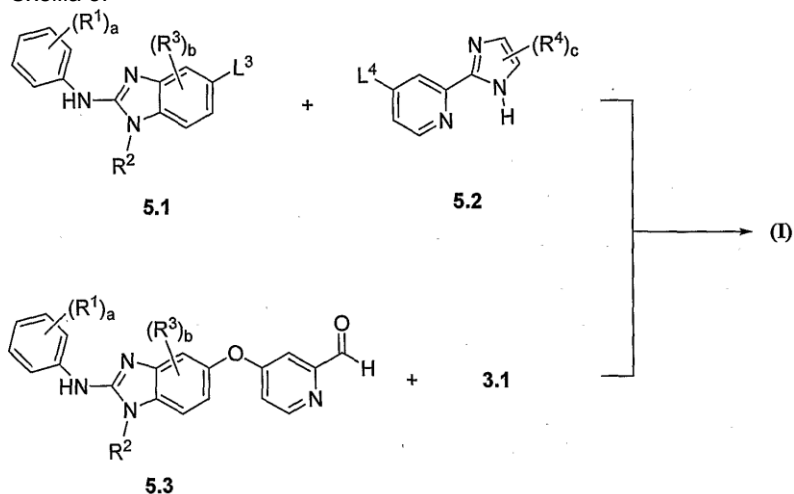
Схема 4:



У альтернативному варіанті сполуки, запропоновані у винаході, можна синтезувати з використанням модифікованої послідовності реакцій сполучення. На схемі 5 проілюстроване сполучення сполуки 5.1 зі сполукою 5.2 з формуванням зв'язку, що являє собою простий ефір, і сполучення сполуки 5.3 зі сполукою 3.1 з одержанням імідазольного кільця як передостання стадія одержання повністю замкнутого пентациклічного ядра. У проміжних продуктах 5.1 та 5.2 один з радикалів L^3 або L^4 являє собою галоген, а інший з радикалів L^3 або L^4 являє собою OH . Ці проміжні

продукти можна одержувати як показано на наведених вище схемах з використанням придатних вихідних матеріалів та/або захисних груп у відповідних послідовностях реакцій. Такі фактори відомі фахівцеві в даній області. Наприклад, альдегід 5.3 можна одержувати шляхом відновлення відповідного карбонітрилу, синтез якого описаний у прикладі 60, гібридом діізобутилалюмінію. Шляхом взаємодії альдегіду 5.3 відповідно до наведеної вище схеми 3 з кетоном 3.1 одержують сполуки формули (I).

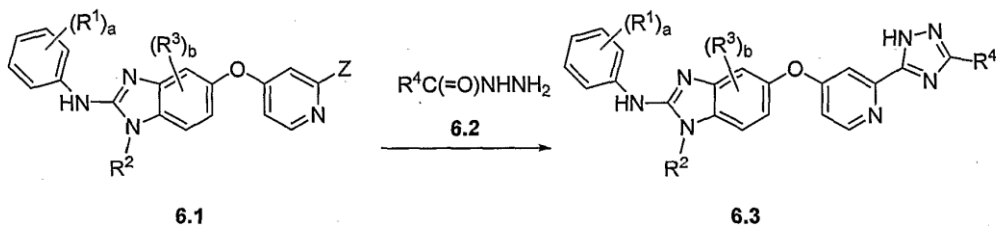
Схема 5:



Сполуки, запропоновані у винаході, які мають триазольну кінцеву групу, можна одержувати як проілюстровано на схемі 6, шляхом взаємодії

сполуки 6.1, у якій Z являє собою карбонітрил, з гідразидом 6.2. Приклад синтезу сполуки 6.3 описаний у прикладі 60.

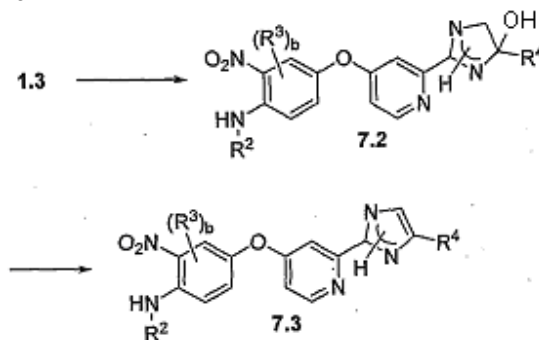
Схема 6:



Слід мати на увазі, що імідазольні проміжні продукти, використовувані в реакціях сполучення, можна одержувати за допомогою інших шляхів синтезу. Один з таких прикладів проілюстрований на схемі 7. Сполуку 1.3, у якій Z являє собою CN, перетворюють у сполуку, у якій Z являє собою амідногрупу. Це перетворення можна здійснювати шляхом взаємодії сполуки 1.3 з алкоксидом, таким як метоксид, з перетворенням карбонітрилу в складний імідатний ефір, що потім піддають взаємодії з амонієвим реагентом, таким як ацетат амонію або бензоат амонію, з одержанням амідину. Шляхом взаємодії амідину зі сполукою (Va), у якій X^a являє собою відхідну групу, одержують

алкільовану та циклізовану сполуку 7.2 або її таутомер. Шляхом нагрівання сполуки 7.2 видаляють воду (дегідратація) і одержують проміжний продукт 7.3. Інші умови дегідратації включають обробку сполуки 7.2 органічними кислотами, такими як оцтова кислота, метансульфонова кислота, камфорсульфонова кислота, трифторметансульфонова кислота та трифтороцтова кислота, а також неорганічними кислотами, такими як соляна кислота та сірчана кислота. Чотири реакції - утворення складного імідатного ефіру, утворення амідину, алкілювання/циклізація та дегідратація, як правило, здійснюють у вигляді послідовності реакцій в одній посудині.

Схема 7:



Сполуки, запропоновані у винаході, можна застосовувати для інгібування *in vitro* або *in vivo* росту ракових клітин. Сполуки можна використовувати окремо або в поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм або ексципієнтом. Придатні фармацевтично прийнятні носії або ексципієнти являють собою, наприклад, процесуючі агенти та модифікатори введення лікарського засобу та посилюючі агенти, такі, наприклад, як фосфат кальцію, стеарат магнію, тальк, моносахариди, дисахариди, крохмаль, желатин, целюлоза, метилцелюлоза, натрійкарбоксиметилцелюлоза, декстроза, гідроксипропіл- β -циклодекстрин, полівінілпіролідон, воски з низькою температурою плавлення, іонообмінні смоли і т.п., а також комбінації будь-яких двох або більшої кількості зазначених сполук. Інші придатні фармацевтично прийнятні ексципієнти описані в довіднику «Remington's Pharmaceutical Sciences», з Mack Pub. Co., New Jersey, 1991, включеному в даний опис як посилання.

Ефективні кількості сполук, запропонованих у винаході, як правило, являють собою будь-які кількості, достатні для що помітного інгібування активності Raf, що виявляють за допомогою кожного з способів, представлених у даному описі, інших методів аналізу кіназної активності Raf, які відомі або легко можуть бути вивчені звичайними фахівцями в даній галузі, або визначають за інгібуванням або ослабленням симптомів раку.

Кількість діючої речовини, яку можна поєднувати з носіями з одержанням лікарської форми у вигляді одноразової дози, повинна варіюватися залежно від пацієнта, що підлягає лікуванню, і конкретного шляху введення. Однак слід розуміти, що конкретний рівень доз для будь-якого конкретного пацієнта повинен залежати від різних факторів, включаючи активність конкретної застосовуваної сполуки, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, статі, дієту, час введення, шлях введення, швидкість екскреції, комбінацію лікарських засобів і серйозність конкретного захворювання, що підлягає лікуванню. Терапевтично ефективну кількість у конкретній ситуації легко можна визначати за допомогою загальноприйнятих експериментів, і рішення цього питання знаходиться в межах компетенції звичайного лікаря.

Для цілей даного винаходу під терапевтично ефективною дозою звичайно мають на увазі загальну добову дозу, що вводять пацієнтові, у вигляді одноразових або розділених доз у кількості, наприклад, від 0,001 до 1000 мг/кг маси тіла щодня, від 1,0 до 30 мг/кг маси тіла щодня. До складу стандартної дози можуть входити такі кількості складових, які достатні для одержання добової дози.

Сполуки, запропоновані в даному винаході, можна вводити перорально, парентально, під'язично, за допомогою аерозолі або спрею для інгаляції, ректально або місцево у вигляді стандартних доз, що містять загальноприйняті нетоксичні фармацевтично прийнятні носії, ад'юванти та наповнювачі, за необхідності. Місцеве застосування може передбачати також черезшкірне введення, наприклад, за допомогою черезшкірних бляшок або пристроїв для іонофорезу. Поняття «паренте-

ральний» у контексті даного опису включає підшкірні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньозовні, надчревні ін'єкції або інфузії.

Препарати для ін'єкцій, наприклад, стерильні ін'єкційні водні або масляні суспензії, можна одержати за допомогою прийнятних відомих у даній області диспергуючих або змочувальних агентів і суспендуєчих агентів. Стерильний препарат для ін'єкцій може являти собою також стерильний ін'єкційний розчин або суспензію в нетоксичному прийнятному для парентерального введення розріджувачі або розчиннику, наприклад, розчин в 1,3-пропандіолі. Прийнятними наповнювачами або розчинниками є стерілізована вода, розчин Рінгера або ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, як розчинники або суспендуєчі середовища можна застосовувати стерильні жирні масла. Для цієї мети можна застосовувати будь-яку суміш жирних масел, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. Крім того, у складі ін'єкційних препаратів знайшли застосування жирні кислоти, такі як олеїнова кислота.

Супозиторії для ректального введення лікарського засобу можна одержувати шляхом змішування лікарського засобу із прийнятним не викликаючим подразнення ексципієнтом, таким як масло какао та поліетиленгліколи, які знаходяться у твердій фазі при нормальній температурі, але знаходяться у рідкій фазі при температурі прямої кишки та тому розплавляються в прямій кишці із вивільненням лікарського засобу.

Тверді лікарські форми для перорального введення можуть являти собою капсули, таблетки, пігулки, порошки та гранули. У таких твердих лікарських формах діюча речовина може змішуватися щонайменше з одним інертним розріджувачем, таким як сахароза, лактоза або крохмаль. Такі лікарські форми можуть містити також відповідно до загальноприйнятої практики додаткові субстанції, відмінні від інертних розріджувачів, наприклад, лібриканти, такі як стеарат магнію. У випадку капсул, таблеток та пігулок лікарські форми можуть містити також забуферуючі агенти. Таблетки та пігулки можна одержувати також з ентросолубільними покриттями.

Рідкі лікарські форми для перорального введення можуть являти собою фармацевтично прийнятні емульсії, розчини, суспензії, сиропи та еліксири, що містять інертні розріджувачі, які звичайно застосовують у даній галузі техніки, наприклад, воду. Такі композиції можуть включати також ад'юванти, такі як змочувальні агенти, емульгатори та суспендуєчі агенти, циклодекстрини та підсолоджувачі, ароматизатори та віддушки.

Сполуки, запропоновані в даному винаході, можна вводити також у формі ліпосом. Як відомо в даній галузі, ліпосоми, як правило, одержують із фосфоліпідів або інших ліпідних субстанцій. Ліпосоми складаються з моно- або багатопшарових гідратованих рідких кристалів, які дисперговані у водному середовищі. Для одержання ліпосом можна використовувати будь-який нетоксичний фізіологічно прийнятний і метаболізуємий ліпід. Запропоновані в даному винаході композиції у формі ліпо-

сом можуть містити крім сполуки, запропонованої в даному винаході, стабілізатори, консерванти, ексципієнти тощо. Кращими ліпідами є фосфоліпіди та фосфатидилхоліни (лецитини), що як зустрічаються в природних умовах, так і синтетичні. Методи одержання ліпосом відомі в даній області (див. наприклад, *Methods in Cell Biology*, том XIV, під ред. Prescott, з Academic Press, New York, N. W., 1976, стор. 33 і далі).

Хоча сполуки, запропоновані у винаході, можна застосовувати у вигляді одного фармацевтичного агента, їх можна використовувати також у поєднанні з одним або декількома іншими агентами, застосовуваними для лікування раку. Сполуки, запропоновані в даному винаході, можна застосовувати також у поєднанні з відомими іншими терапевтичними агентами та протираковими агентами, і комбінації запропонованих у даному винаході сполук з іншими протираковими або хімотерапевтичними агентами попадають у обсяг винаходу. Приклади таких агентів описані в *Cancer Principles and Practice of Oncology*, під ред. V. T. Devita та S. Hellman, 6-е вид., з Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 15 лютого 2001 р. Фахівець у даній області може визначати, які комбінації агентів можна застосовувати, ґрунтуючись на конкретних характеристиках лікарських засобів і рака, що підлягає лікуванню. До таких протиракових агентів відносяться (але не обмежуючись ними) наступні субстанції: модулятори рецепторів естрогену, модулятори рецепторів андрогену, модулятори ретиноїдних рецепторів, цитотоксичні/цитостатичні агенти, антипроліферативні агенти, інгібітори преніл-протеїнтрансферази, інгібітори HMG-CoA-редуктази та інші інгібітори ангиогенезу, інгібітори клітинної проліферації та шляхи передачі сигналів виживання, індукуючі апоптоз речовини та агенти, взаємодіючі з реперними точками клітинного циклу. Сполуки, запропоновані у винаході, можна застосовувати також у поєднанні із променевою терапією.

Таким чином, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу сполуки, запропоновані у винаході, застосовують також у поєднанні з відомими протираковими агентами, такими, наприклад, як модулятори рецепторів екстрогену, модулятори рецепторів андрогену, модулятори ретиноїдних рецепторів, цитотоксичні агенти, антипроліферативні агенти, інгібітори преніл-протеїнтрансферази, інгібітори HMG-CoA-редуктази, інгібітори ВІЛ-протеази, інгібітори зворотної транскриптази та інші інгібітори ангиогенезу.

До модуляторів рецепторів естрогену відносяться сполуки, які взаємодіють або інгібують зв'язування естрогену з рецептором поза залежністю від механізму дії. Приклади модуляторів рецепторів екстрогену включають (але не обмежуючись ними) тамоксифен, ралоксифен, ідоксифен, LY353381, LY117081, тореміфен, фулвестрант, 4-[7-(2,2-диметил-1-оксипропокси-4-метил-2-[4-[2-(1-піперидиніл)етокси]феніл]-2H-1-бензпіран-3-іл)]-феніл-2,2-диметилпропаноат, 4,4'-дигідроксибензофенон-2,4-динітрофенілгідразон та SH646.

До модуляторів рецепторів андрогену відно-

сяться сполуки, які взаємодіють або інгібують зв'язування андрогену з рецептором андрогену. Типовими прикладами модуляторів рецепторів андрогену є фінастероїд та інші інгібітори 5 α -редуктази, нілутамід, флутамід, бікалутамід, ліарозол та абіратенону ацетат. До модуляторів ретиноїдних рецепторів відносяться сполуки, які взаємодіють або інгібують зв'язування ретиноїдів з ретиноїдним рецептором. Прикладами модуляторів ретиноїдних рецепторів є бексаротен, третиноїн, 13-цис-ретиноева кислота, 9-цис-ретиноева кислота, α -дифторметилорнітин, LX23-7553, транс-N-(4'-гідроксифеніл)ретинамід та N4-карбоксифенілретинамід.

Цитотоксичні та/або цитостатичні агенти являють собою сполуки, які викликають загибель клітин або інгібують проліферацію клітин, насамперед шляхом безпосередньої взаємодії із клітинною функцією, або шляхом інгібування, або впливаючи на мітоз клітин, до них відносяться алкілюючі агенти, фактори некрозу пухлини, інтеркалятори, сполуки, що активуються гіпоксією, інгібітори мікротрубок/стабілізаторів мікротрубок, інгібітори мітотичних кінезинів, інгібітори кіназ, що беруть участь у розвиненні мітозу, антиметаболіти; модифікатори біологічних відповідей; гормональні/антигормональні терапевтичні агенти, гематопетичні фактори росту, терапевтичні агенти, мічені моноклональними антитілами, інгібітори топоізомерази, інгібітори протеосом та інгібітори убіквітин-лігази. Прикладами цитотоксичних агентів є (але не обмежуючись ними) сертенеф, хакектин, іфосфамід, тасонермін, лонідамін, карбоплатин, алтретамін, преднімустин, дибромдулцитол, ранімустин, фотемустин, недаплатин, оксаліплатин, темозоломід, гептаплатин, естрамустин, імпросульфату тозилат, трофосфамід, німустин, диброспідію хлорид, пумітепа, лобаплатин, сатраплатин, профіроміцин, цисплатин, ірофулвен, дексифосфамід, цис-аміндихлор(2-метилпіридин)платина, бензилгуанін, глуфосфамід, GPX100, тетрахлорид (транс, транс, транс)-біс-му(гексан-1,6-діамін)-му-[діамінплатина(II)]біс[діамін(хлор)платини(II)], діаризидинілспермін, триоксид миш'яку, 1-(11-додециламіно-10-гідроксиундецил)-3,7-диметилксантин, зорубіцин, ідарубіцин, даунорубіцин, бісантрен, мітоксантрон, пірарубіцин, пінафід, валрубіцин, амрубіцин, антинеопластон, 3'-деаміно-3'-морфоліно-13-дезоксо-10-гідроксикарміноміцин, аннаміцин, галарубіцин, елінафід, MEN10755 та 4-деметокси-3-деаміно-3-азиридиніл-4-метилсульфонілдаунорубіцин (див. WO 00/50032). Типовим прикладом сполуки, що активується гіпоксією, є тирапазамін. Інгібіторами протеосоми є (але не обмежуючись ними) лактацистин і бортезоміб. Прикладами інгібіторів мікротрубок/стабілізаторів мікротрубок є паклітаксел, віндесину сульфат, 3',4'-дидегідро-4'-дезоксид-8'-норвінкалеукобластин, доцетаксол, ризоксин, доластатин, мівобуліну ізетонат, ауристатин, цемадотин, RPR109881, BMS 184476, вінфлунін, криптофіцин, 2,3,4,5,6-пентафтор-N-(3-фтор-4-метоксифеніл)бензол-сульфонамід, ангідровінбластин, N,N-диметил-L-валіл-L-валіл-N-метил-L-

валіл-L-проліл-L-пролін-трет-бутиламід, TDX258, епотілоні (см, наприклад, U.S. 6284781 і 6288237) і BMS188797. Типові приклади інгібіторів топоізомери включують топотекан, гікаптамін, ірино-текан, рубітекан, 6-етоксипропіоніл-3',4'-О-ексо-бензиліденхартреусин, 9-метокси-N,N-диметил-5-нітропіразол[3,4,5-kl]акридин-2-(6H)-пропанамін, 1-аміно-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':b,7]індолізино[52b]хінолін-10,13(9H, 15H)діон, луртотекан, 7-[2-(N-ізопропіламіно)етил]-(20S)кампотецин, BNP1350, BNP11100, BN80915, BN80942, етопозиду фосфат, теніпосид, собузоксан, 2'-диметиламіно-2'-дезокситетопозид, GL331, N-[2-(диметиламіно)етил]-9-гідрокси-5,6-диметил-6H-пиридо[4,3-b]карбазол-1-карбоксамід, асулакрин, (5a, 5aB, 8aa, 9b)-9-[2-[N-[2-(диметиламіно)етил]-N-метиламіно]етил]-5-[4-гідрокси-3,5-диметоксифеніл]-5,5a,6,8,8a,9-гексагідрофуоро(3',4':6,7)нафто(2,3-d)-1,3-діоксол-6-он, 2,3-(метилендіокси)-5-метил-7-гідрокси-8-метоксибензо[c]-фенантридиній, 6,9-бис[(2-аміноетил)-аміно]бензо[g]ізогуїнолін-5,10-діон, 5-(3-амінопропіламіно)-7,10-дигідрокси-2-(2-гідроксиетиламінометил)-6H-піразоло[4,5,1'-de]акридин-6-он, N-[1-[2-(діетиламіно)етиламіно]-7-метокси-9-оксо-9H-тіоксантен-4-ілметил]формамід, N-(2-(диметиламіно)етил)акридин-4-карбоксамід, 6-[[2-(диметиламіно)етил]аміно]-3-гідрокси-7H-індено[2,1-c]хінолін-7-он і димесна. Приклади інгібіторів мітотичних кінезинів, таких як людський мітотичний кінезин KSP, описані у публікаціях PCT WO 01/30768 і WO 01/98278, WO 03/050064 (19 червня 2003 р.), WO 03/050122 (19 червня 2003 р.), WO 03/049527 (19 червня 2003 р.), WO 03/049679 (19 червня 2003 р.), WO 03/049678 (19 червня 2003 р.) і WO 03/39460 (15 травня 2003 р.) та заявках, що знаходяться на розгляді, PCT US 03/06403 (зарєєстрована 4 березня 2003 р.), US 03/15861 (зарєєстрована 19 травня 2003 р.), US 03/15810 (зарєєстрована 19 травня 2003 р.), US 03/18482 (зарєєстрована 12 червня 2003 р.) та US 03/18694 (зарєєстрована 12 червня 2003 р.). В одному з варіантів здійснення винаходу інгібітори мітотичних кінезинів включають (не обмежуючись ними) інгібітори KSP, інгібітори MKLP1, інгібітори CENP-E, інгібітори MCAK, інгібітори Kif14, інгібітори Mphosph1 та інгібітори Rab6-KIFL.

Інгібітори кіназ, що беруть участь у розвиненні мітозу, включають (але не обмежуючись ними) інгібітори аурора-кінази, інгібітори Polo-подібних кіназ (PLK) (наприклад, інгібітори PLK-I), інгібітори bub-1 та інгібітори bub-R1. Антипроліферативні агенти включають антисмислові РНК- і ДНК-олігонуклеотиди, такі як G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231 та INX3001, та антиметаболіти, такі як еноцитабін, кармофур, тегафур, пен-тостатин, доксифлуридин, триметрексад, флударабін, капецитабін, галоцитабін, цитарабіну окфосфат, гідрат фостеабіну натрію, ралтитрексед, палтитрексед, емітефур, тіазофуридин, децитабін, нолатрексед, пеметрексед, нелзарабін, 2'-дезоксид-2'-метиліденцитидин, 2'-фторметилден-2'-дезоксидцитидин, N-[5-(2,3-

дигідробензофурил)сульфоніл]-N'-(3,4-дихлорфеніл)сечовина, N6-[4-дезоксид-4-[N2-[2(E),4(E)-тетрадекадієноіл]гліциламіно]-L-гліцеро-В-L-манногептопіранозил]аденін, аплідін, ектейна-сцидин, троксацитабін, 4-[2-аміно-4-оксо-4,6,7,8-тетрагідро-3H-піримідино[554-b]]1,4]тіазин-6-іл-(S)-етил]-2,5-тієноіл-L-глутамінова кислота, аміноптерин, 5-фторурацил, аланосин, 11-ацетил-8-(карбамоїлоксиметил)-4-форміл-6-метокси-14-окса-1,1-діазатетрацикло(7.4.1.0.0)-тетрадека-2,4,6-триєн-9-іловий ефір оцтової кислоти, свайн-сонін, лометрексол, декстразоксан, метіоніназа, 2'-ціано-2'-дезоксид-N4-пальмітоіл-1-В-D-арабінофуранозилцитозин та 3-амінопіридин-2-карбоксальдегідтіосемікарбазон. Прикладами терапевтичних агентів, мічених моноклональними антитілами, є такі терапевтичні агенти, які несуть цитотоксичні агенти або радіоізотопи, пов'язані з моноклональним антитілом, специфічним відносно ракової клітини або клітини-мішені. Прикладом є, зокрема, Веххаг. Інгібітори HMG-CoA-редуктази являють собою інгібітори 3-гідрокси-3-метилглутарил-CoA-редуктази. Сполуки, що мають інгібуючу активність у відношенні HMG-CoA-редуктази, можна легко ідентифікувати за допомогою способів аналізу, добре відомих у даній галузі, таких як способи, описані або процитовані у U.S. 4231938 та WO 84/02131. Прикладами інгібіторів HMG-CoA-редуктази, які можна застосовувати, є (але не обмежуючись ними) ловастатин (MEV ACOR(R); див. U.S. 4231938, 4294926 та 4319039), симвастатин (ZOCOR(R); див. U.S. 4444784, 4820850 та 4916239), правастатин (PRAVACHOL(R); див. U.S. 4346227, 4537859, 4410629, 5030447 та 5180589), флувастатин (LESCOL(R); див. U.S. 5354772, 4911165, 4929437, 5189164, 5118853, 5290946 та 5356896) і аторвастатин (LIPITOR(R); див. U.S. 5273995, 4681893, 5489691 та 5342952). Структурні формули цих та інших інгібіторів HMG-CoA-редуктази, які можна застосовувати в способах, запропонованих у даному винаході, описані на стор. 87 у M. Yalpani, «Cholesterol Lowering Drugs», з Chemistry & Industry, 5 лютого 1996 р., стор. 85-89 та в U.S. 4782084 та 4885314. В одному з варіантів здійснення винаходу інгібітор HMG-CoA-редуктази вибирають із ловастатину та симвастатину.

До інгібіторів преніл-протеїнтрансферази відносяться сполуки, які інгібують один фермент або будь-яку комбінацію ферментів преніл-протеїнтрансфераз, включаючи фарнезил-протеїнтрансферазу (FPTазу), геранілгераніл-протеїнтрансферазу типу I (GGPTаза-I) і геранілгераніл-протеїнтрансферазу типу II (GGPTаза-II, що називають також Rab GGPTазой). Прикладами сполук, що інгібують преніл-протеїнтрансферазу, є (±)-6-[аміно(4-хлорфеніл)](1-метил-1H-імідазол-5-іл)метил]-4-(3-хлорфеніл)-1-метил-2(1H)хінолінон, (-)-6-[аміно(4-хлорфеніл)](1-метил-1H-імідазол-5-іл)метил]-4-(3-хлорфеніл)-1-метил-2(1H)-хінолінон, (+)-6-[аміно(4-хлорфеніл)](1-метил-1H-імідазол-5-іл)метил]-4-(3-хлорфеніл)-1-метил-2(1H)-хінолінон, 5(S)-н-бутил-1-(2,3-диметилфеніл)-4-[1-(4-ціанобензил)-5-імідазолілметил-2-піперазинон, (S)-1-(3-хлорфеніл)-4-[1-(4-ціанобензил)-5-

імідазолілметил]-5-[2-(етансульфоніл)метил]-2-піперазинон, 5(S)-н-бутил-1-(2-метилфеніл)-4-[1-(4-ціанобензил)-5-імідазолілметил]-2-піперазинон, 1-(3-хлорфеніл)-4-[1-(4-ціанобензил)-2-метил-5-імідазолілметил]-2-піперазинон, 1-(2,2-дифенілетил)-3-[N-(1-(4-ціанобензил)-1H-імідазол-5-ілетил)карбамоіл]піперидин, 4-{[4-гідроксиметил-4-(4-хлорпіридин-2-ілметил)піперидин-1-ілметил]-2-метилімідазол-1-ілметил}бензонітрил, 4-{5-[4-гідроксиметил-4-(3-хлорбензил)піперидин-1-ілметил]-2-метилімідазол-1-ілметил}бензонітрил, 4-{3-[4-(2-оксо-2H-піридин-1-іл)бензил]-3H-імідазол-4-ілметил}бензонітрил, 4-{3-[4-(5-хлор-2-оксо-2H-[1,2']біпіридин-5'-ілметил)-3H-імідазол-4-ілметил}бензонітрил, 4-{3-[4-(2-оксо-2H-[1,2']біпіридин-5'-ілметил)-3H-імідазол-4-ілметил}бензонітрил, 4-{3-(2-оксо-1-феніл-1,2-дигідропіридин-4-ілметил)-3H-імідазол-4-ілметил}бензонітрил, 18,19-дигідро-19-оксо-5H,17H-6,10:12,16-диметен-1H-імідазо[4,3-c][1,11,4]діоксаазаціклононадецин-9-карбонітрил, (±)-19,20-дигідро-19-оксо-5H-18,21-етан-12,14-етен-6,10-метен-22H-бензо[d]імідазо[4,3-k]-[1,6,9,12]оксатриазаціклооктадецин-9-карбонітрил, 19,20-дигідро-19-оксо-5H,17H-18,21-етано-6,10:12,16-диметено-22H-імідазо[3,4-h][1,8,11,14]оксатриазаціклооейкозин-9-карбонітрил та (±)-19,20-дигідро-3-метил-19-оксо-5H-18,21-етано-12,14-етено-6,10-метено-22H-бензо[d]імідазо[4,3-k][1,6,9,12]оксатриазаціклооктадецин-9-карбонітрил. Інші приклади інгібіторів преніл-протеїнтрансфераз можна знайти в наступних публікаціях і патентах: WO 96/30343, WO 97/18813, WO 97/21701, WO 97/23478, WO 97/38665, WO 98/28980, WO 98/29119, WO 95/32987, U.S. 5420245, U.S. 5523430, U.S. 5532359, U.S. 5510510, U.S. 5589485, U.S. 5602098, публікація європейського патенту 0 618 221, публікація європейського патенту 0604181, публікація європейського патенту 0696593, WO 94/19357, WO 95/08542, WO 95/11917, WO 95/12612, WO 95/12572, WO 95/10514, U.S. 5661152, WO 95/10515, WO 95/10516, WO 95/24612, WO 95/34535, WO 95/25086, WO 96/05529, WO 96/06138, WO 96/06193, WO 96/16443, WO 96/21701, WO 96/21456, WO 96/22278, WO 96/24611, WO 96/24612, WO 96/05168, WO 96/05169, WO 96/00736, U.S. 5571792, WO 96/17861, WO 96/33159, WO 96/34850, WO 96/34851, WO 96/30017, WO 96/30018, WO 96/30362, WO 96/30363, WO 96/31111, WO 96/31477, WO 96/31478, WO 96/31501, WO 97/00252, WO 97/03047, WO 97/03050, WO 97/04785, WO 97/02920, WO 97/17070, WO 97/23478, WO 97/26246, WO 97/30053, WO 97/44350, WO 98/02436 та U.S. 5532359. Роль інгібітору преніл-протеїнтрансферази у ангиогенезі описана, наприклад, в *European J. of Cancer* 55(9), 1999, стор. 1394-1401.

Інгібітори ангиогенезу являють собою сполуки, які інгібують утворення нових кровоносних судин поза залежністю від механізму дії. Приклади інгібіторів ангиогенезу включають (але не обмежуючись

ними) тирозинкіназні інгібітори, такі як інгібітори тирозинкіназних рецепторів Flt-1 (VEGFR1) і Flk-1/KDR (VEGFR2), інгібітори епідермального, фібробластного або тромбоцитарного факторів росту, інгібітори MMP (матриксна металопротеаза), блокатори інтегрину, інтерферон-альфа, інтерлейкін-12, пентозанполісульфат, інгібітори циклооксигенази, включаючи нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НСПЗЗ) типу аспірину та ібупрофену, а також вибіркові інгібітори циклооксигенази-2 типу целекоксиба та рофекоксиба (PNAS, 89, 1992, с. 7384; JNCI 69, 1982, с. 475; Arch. Ophthalmol. 108, 1990, с. 573; Anat. Rec., (238), 1994, с. 68; FEBS Letters 372, 1995, с. 83; Clin. Orthop. 313, 1995, с. 76; J Mo Endocrinol. 16, 1996, с. 107; Jpn. J. Pharmacol. 75, 1997, с. 105; Cancer Res. 57, 1997, с. 1625; Cell 93, 1998, с. 705; Intl. J. Mo. Med. 2, 1998, с. 715; J Biol. Chem. 274, 1999, с. 9116), стероїдні протизапальні лікарські засоби (такі як кортикостероїди, мінералокортикоїди, дексаметазон, преднізон, преднізолон, метилпред, бетаметазон), карбоксиамідотриазол, комбретастатин A4, скваламін, 6-О-хлорацетилкарбонілфумагілол, талідомід, ангиостатин, тропонін-1, антагоністи ангиотензину II (див. Fernandez та ін., J Lab. Clin. Med. 105, 1985, стор. 141-145) та антитіла до VEGF (див. Nature Biotechnology, 17 жовтня 1999 р., стор. 963-968; Kim та ін., Nature, 362, 1993, стор. 841-844; WO 00/44777; і WO 00/61186). Інші терапевтичні агенти, які модулюють або інгібують ангиогенез та які можна застосовувати в поєднанні зі сполуками, запропонованими в даному винаході, включають агенти, які модулюють або інгібують системи коагуляції та фібринолізу (див. огляд в Clin. Chem. La. Med. 38, 2000, стор. 679-692). Прикладами агентів, які модулюють або інгібують шляхи коагуляції та фібринолізу, є (але не обмежуючись ними) гепарини (див. Thromb. Haemost. 80, 1998, стор. 10-23), низькомолекулярні гепарини та інгібітори карбоксипептидази U (відомі також як інгібітори інгібітору фібринолізу, що активується активним тромбіном [TAFIa]) (див. Thrombosis Res. 101, 2001, стор. 329-354). Інгібітори TAFIa описані в опублікованій заявці PCT WO 03/013526 та U.S. 60/349925 (зарєєстрована 18 січня 2002 р.). У обсяг винаходу попадають також комбінації сполук, запропонованих у винаході, із НСПЗЗ, які є вибілковими інгібіторами COX-2 (до яких відносять, як правило, сполуки, які мають щонайменше в 100 разів більш високу специфічність у відношенні інгібування COX-2 у порівнянні з COX-1 при оцінці співвідношення значення IC₅₀ для COX-2 у порівнянні зі значенням IC₅₀ для COX-1 за допомогою клітинних або мікросомальних аналізів). Такі сполуки включають (але не обмежуючись ними) сполуки, описані в U.S. 5474995, виданому 12 грудня 1995 р., U.S. 5861419, виданому 19 січня 1999 р., U.S. 6001843, виданому 14 грудня 1999 р., U.S. 6020343, виданому 1 лютого 2000 р., U.S. 5409944, виданому 25 квітня 1995 р., U.S. 5436265, виданому 25 липня 1995 р., U.S. 5536752, виданому 16 липня 1996 р., U.S. 5550142, виданому 27 серпня 1996 р., U.S. 5604260, виданому 18 лютого 1997 р., U.S. 5698584, виданому 16 грудня 1997 р., U.S. 5710140, виданому 20 січня 1998 р., WO 94/15932,

опублікованої 21 липня 1994 р., U.S. 5344991, виданому 6 червня 1994 р., U.S. 5134142, виданому 28 липня 1992 р., U.S. 5380738, виданому 10 січня 1995 р., U.S. 5393790, виданому 20 лютого 1995 р., U.S. 5466823, виданому 14 листопада 1995 р., U.S. 5633272, виданому 27 травня 1997 р., і U.S. 5932598, виданому 3 серпня 1999 р., які всі включені в даний опис як посилання. Типові інгібітори COX-2, які можна застосовувати в способах, запропонованих у даному винаході, включають 3-феніл-4-(4-(метилсульфоніл)феніл)-2-(5H)-фуранон та 5-хлор-3-(4-(метилсульфоніл)феніл)-2-(2-метил-5-піридиніл)піридин. Сполуки, які описані як специфічні інгібітори COX-2 та які, отже, можна застосовувати згідно із даним винаходом, і методи їх синтезу можна знайти в наступних патентах, заявках, що знаходяться у розгляді, і публікаціях, які включені в даний опис як посилання: WO 94/15932, опублікована 21 липня 1994 р., U.S. 5344991, виданий 6 червня 1994 р., U.S. 5134142, виданий 28 липня 1992 р., U.S. 5380738, виданий 10 січня 1995 р., U.S. 5393790, виданий 20 лютого 1995 р., U.S. 5466823, виданий 14 листопада 1995 р., U.S. 5633272, виданий 27 травня 1997 р., U.S. 5932598, виданий 3 серпня 1999 р., U.S. 5474995, виданий 12 грудня 1995 р., U.S. 5861419, виданий 19 січня 1999 р., U.S. 6001843, виданий 14 грудня 1999 р., U.S. 6020343, виданий 1 лютого 2000 р., U.S. 5409944, виданий 25 квітня 1995 р., U.S. 5436265, виданий 25 липня 1995 р., U.S. 5536752, виданий 16 липня 1996 р., U.S. 5550142, виданий 27 серпня 1996 р., U.S. 5604260, виданий 18 лютого 1997 р., U.S. 5698584, виданий 16 грудня 1997 р. та U.S. 5710140, виданий 20 січня 1998 р. Інші приклади інгібіторів ангіогенезу включають (але не обмежуючись ними) ендостатин, україн, ранпірназу, IM862, 5-метокси-4-[2-метил-3-(3-метил-2-бутеніл)оксираніл]-1-оксаспіро[2,5]окт-6-іл(хлорацетил)карбамат, ацетилдиналин, 5-аміно-1-[[3,5-дихлор-4-(4-хлорбензил)феніл]метил]-1H-1,2,3-триазол-4-карбоксамід, CM101, скваламін, комбрестатин, RPI4610, NX31838, сульфований манопентозофосфат, 7,7-(карбонілбіс[іміно-N-метил-4,2-піролокарбоніліміно][N-метил-4,2-пірол]карбоніліміно)-біс-(1,3-нафталіндісульфонат) і 3-[(2,4-диметилпірол-5-іл)метилен]-2-індолінон (SU5416).

До агентів, які впливають на реперні точки клітинного циклу, відносяться сполуки, що інгібують протеїнкінази, які беруть участь у трансдукції сигналів реперних точок клітинного циклу, підвищуючи чутливість тим самим ракових клітин до агентів, що ушкоджують ДНК. До таких агентів відносяться інгібітори ATR, ATM, Chk1- і Chk2-кіназ та інгібітори cdk- і cdc-кіназ, і їх конкретними прикладами є 7-гідроксистауропорин, флавопіридол, CYC202 (циклацел) і BMS-387032.

Інгібітори клітинної проліферації та шляхи передачі сигналів виживання являють собою фармацевтичні агенти, які інгібують рецептори клітинної поверхні та каскади трансдукції сигналів у напрямку їх поширення від цих поверхневих рецепторів. До таких агентів відносяться інгібітори інгібіторів EGFR (наприклад гефітиніб та ерлотиніб), інгібіто-

ри ERB-2 (наприклад, трастузумаб), інгібітори IGFR, інгібітори цитокінових рецепторів, інгібітори MET5, інгібітори PI3K (наприклад LY294002), серінових/треонінових кіназ (включаючи (але не обмежуючись ними) інгібітори Akt, описані в WO 02/083064, WO 02/083139, WO 02/083140 та WO 02/083138), інгібітори кінази Raf (наприклад, BAY-43-9006), інгібітори MEK (наприклад CI-1040 та PD-098059) і інгібітори mTOR (наприклад, Wyeth CCI-779). Такі агенти включають низькомолекулярні інгібітори та антагоністи антитіл.

До агентів, що індукують апоптоз, відносяться активатори представників сімейства TNF-рецепторів (включаючи TRAIL-рецептори).

У деяких варіантах здійснення винаходу до типових агентів, які можна застосовувати в поєднанні зі сполуками, запропонованими у винаході, для лікування раку, відносяться, наприклад, ірино-текан, топотекан, геміцитабін, 5-фторурацил, леуковорин, карбоплатин, цисплатин, таксани, теза-цитабін, циклофосфамід, алкалоїди вінка, іматиніб (глівек), антрацикліни, ритуксимаб, трастузумаб, а також інші протиракові хіміотерапевтичні агенти.

Вищевказані сполуки, які можна застосовувати в поєднанні зі сполуками, запропонованими у винаході, слід використовувати в терапевтичних кількостях, зазначених у настільному довіднику лікаря (PDR) 47-ого вид. (1993), що включений у даний опис як посилання, або в таких терапевтичних кількостях, які повинні бути відомі звичайному фахівцеві в даній області.

Сполуки, запропоновані у винаході, і інші протиракові агенти можна вводити в рекомендованих максимальних клінічних дозах або в більш низьких дозах. Рівень доз діючої речовини в композиціях, запропонованих у винаході, може варіюватися таким чином, щоб досягати необхідної терапевтичної відповіді залежно від шляху введення, серйозності захворювання та реакції пацієнта. Комбінацію можна вводити у вигляді індивідуальних композицій або у вигляді одноразової форми лікарського засобу, що містить обидва агенти. При введенні у вигляді комбінації терапевтичні агенти можна одержувати у вигляді індивідуальних композицій, які застосовують в один і той же час або в різний час, або у вигляді терапевтичних агентів, які можна застосовувати у вигляді однієї композиції.

Антиестрогени, такі як тамоксифен, інгібують ріст раку молочної залози за допомогою індукції припинення клітинного циклу, для чого потрібна активність інгібітору клітинного циклу p27Kip. У цей час встановлено, що активація шляху Ras-Raf-MAP-кіназ змінює статус фосфорилування p27Kip, у результаті чого його інгібуюча активність при припиненні клітинного циклу зменшується, що приводить до стійкості до антиестрогенів (Dopovan та ін., J Biol. Chem. 27(5), 2001, с. 40888). Як описано Dopovan зі співавторами, інгібуювання шляху передачі сигналу MAPK у результаті обробки інгібітором MEK змінює статус фосфорилування p27 у стійких до гормонів лініях клітин раку молочної залози та у результаті відновлює чутливість до гормонів. Таким чином, відповідно до одному з об'єктів винаходу будь-які варіанти сполук формули (I), (II), (III) або (IV) або їх таутомери, фармацев-

втично прийнятні солі або фармацевтично прийнятні солі таутомерів можна використовувати для лікування гормонозалежного раку, такого як рак молочної залози та передміхурової залози, для реверсії стійкості до гормону, що звичайно зустрічається при використанні загальноприйнятих протираківих агентів.

При гематологічних формах раку, таких як хронічний мієлолейкоз (ХМЛ), хромосомна транслокація відповідальна за конститутивно активовану тирозинкіназу BCR-ABL. Страждаючи таким раком пацієнти мають чутливість до глівеку, низькомолекулярного інгібітору тирозинкінази, у результаті інгібування кіназної активності Ab. Однак багато пацієнтів, які страждають прогресуючою стадією захворювання, спочатку реагували на глібек, але пізніше в них спостерігався рецидив через зумовлюючу стійкість мутацій у кіназному домені Ab. У дослідженнях *in vitro* продемонстровано, що BCR-Av1 проявляють свою дію за допомогою характерного для кінази Raf шляху. Крім того, інгібування більше однієї кінази в цьому шляху забезпечує додатковий захист від зумовлюючих стійкість мутацій. Таким чином, відповідно до іншого об'єкта винаходу будь-які варіанти сполук формули (I), (II), (III) або (IV) або їх таутомери, фармацевтично прийнятні солі або фармацевтично прийнятні солі таутомерів можна використовувати в сполученні щонайменше з одним додатковим агентом, таким як глібек, для лікування гематологічних форм раку, таких як хронічний мієлолейкоз (ХМЛ), для реверсії або попередження стійкості щонайменше до одного додаткового агента.

Наступним об'єктом даного винаходу є спосіб інгібування щонайменше однієї серінової/треонінової кінази в шляху передачі сигналу MAPK у індивідуума або лікування біологічного стану, опосередкованого серіновою/треоніновою кіназою шляху передачі сигналу MAPK в індивідуума, що полягає у тому, що вводять терапевтичну композицію, що містить щонайменше одну сполуку формул (I), (II), (III) або (IV) або її таутомер, фармацевтично прийнятну сіль або фармацевтично прийнятну сіль таутомеру, що ефективно інгібує активність щонайменше однієї серінової/треонінової кінази в шляху передачі сигналу MAPK у індивідуума.

Відповідно до цього об'єкта винаходу терапевтичну композицію можна застосовувати для лікування пацієнтів, які мають потребу в лікуванні такими інгібіторами (наприклад, що страждають раком, опосередкованим аномальною передачею сигналу MAPK). До типів раку, опосередкованих аномальною передачею сигналу MAPK, відносяться, наприклад, меланома, папілярний рак, рак щитовидної залози, рак яєчника, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, недрібноклітинний рак легені (NSCLC), гострий лімфобластний лейкоз (ОЛЛ) і гострий мієлолейкоз. Аномальну передачу сигналу MAPK можна інгібувати шляхом введення сполуки, що інгібує форми дикого типу або мутантні форми Ras, Raf, MEK або ERK.

Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб інгібування Ras (дикого типу або мутантної Ras). Спосіб полягає в тому, що вводять у ефекти-

вній кількості будь-які варіанти сполуки формул (I), (II), (III) або (IV) або їх таутомери, фармацевтично прийнятні солі або фармацевтично прийнятні солі таутомерів індивідуумові, що має потребу в цьому.

Іншим варіантом здійснення винаходу є спосіб інгібування Raf (дикого типу або мутантної B-Raf). Спосіб полягає в тому, що вводять у ефективній кількості будь-які варіанти сполуки формул (I), (II), (III) або (IV) або їх таутомери, фармацевтично прийнятні солі або фармацевтично прийнятні солі таутомерів індивідуумові, що має потребу в цьому.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є спосіб інгібування MEK. Спосіб полягає в тому, що вводять у ефективній кількості будь-які варіанти сполуки формул (I), (II), (III) або (IV) або їх таутомери, фармацевтично прийнятні солі або фармацевтично прийнятні солі таутомерів індивідуумові, що має потребу в цьому.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є спосіб інгібування ERK. Спосіб полягає в тому, що вводять у ефективній кількості будь-які варіанти сполуки формул (I), (II), (III) або (IV) або їх таутомери, фармацевтично прийнятні солі або фармацевтично прийнятні солі таутомерів індивідуумові, що має потребу в цьому.

Наведеною як приклад сполукою, що застосовують у способах цього об'єкта винаходу, є 1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл)-(4-трифторметилфеніл)амін, що має високу інгібуючу активність відносно шляху передачі сигналу MAPK, що описано нижче в прикладах 82-86 та 89-90 та показана на Фіг. 6-12Б; 14В та 15. Сполука є сильним інгібітором B-Raf, c-Raf, мутанта B-Raf і мутанта Ras у біохімічних дослідженнях, що видно із прикладу 82, у якому продемонстроване інгібування активності мутанту B-Raf (значення IC₅₀ становить 0,0053 мкМ), інгібування активності B-Raf (значення IC₅₀ 0,068 мкМ) і інгібування активності c-Raf (значення IC₅₀ 0,004 мкМ). Обробка сполукою викликала регрес пухлини на всіх трьох вивчених моделях з використанням ксенотрансплантатів мутантної форми B-Raf (A375M5, MEXF276 та HT29), і інгібування росту пухлини на моделях ксенотрансплантату K-Ras та N-Ras, що узагальнено нижче у таблиці 7 та описано в прикладах 84, 85 та 86.

Аналіз модуляції мішеней у пухлинних клітинах ліній A375M, MEXF276 та HCT-116 після обробки {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл)-(4-трифторметилфеніл)аміном дозволив встановити, що фосфорилування MEK інгібувалося залежно від дози та від часу, що видно з Фіг. 7Б, 8Б і 10В. Крім того, обробка пухлинних клітин ліній A375M, MEXF276 та HCT-116 сполукою, модулювала маркери, розташовані в напрямку поширення сигналу від Raf, включаючи BIM, циклін D1, p27Kip та pAKT, що видно з Фіг. 7Г, 8В і 9В. Ці аналізи, проведені з використанням передклінічних моделей, свідчать про те, що {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл)-(4-трифторметилфеніл)амін має залежну від дози та часу здатність інгібувати як фосфорилування мішені MEK, так і молекули,

що беруть участь у передачі сигналу, розташовані в напрямку поширення сигналу від Raf у шляху MAPK.

Наступним об'єктом даного винаходу є способи інгібування щонайменше одного тирозинкіназного рецептору, вибраного із групи, що включає VEGFR-2, PDGFR- β , pERK, bFGF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, c-Kit та CSF-IR, у індивідуума або лікування біологічного стану, опосередкованого щонайменше одним з VEGFR-2, PDGFR- β , pERK, bFGF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, c-Kit та CSF-IR, що полягають у тому, що вводять терапевтичну композицію, що містить щонайменше одну сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль формули (I), (II), (III) або (IV), що ефективно інгібує тирозинкіназний рецептор у індивідуума.

Терапевтичні сполуки відповідно до цього об'єкту винаходу можна застосовувати для лікування пацієнтів, які мають потребу в лікуванні такими інгібіторами (наприклад, що страждають раком, опосередкованим аномальною передачею сигналу тирозинкіназного рецептору). До форм раку, опосередкованих аномальною передачею сигналу тирозинкіназного рецептору, відносяться, наприклад, меланома, рак молочної залози, рак сечового міхура, рак легені, рак щитовидної залози, рак передміхурової залози, рак яєчника, лейкоз тучних клітин, пухлини зародкових клітин, дрібноклітинна карцинома легені, пухлини, що відносяться до строми шлунково-кишкового тракту, гострий мієлолейкоз (ОМЛ), нейробластома та рак підшлункової залози.

Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб інгібування VEGFR-2. Спосіб полягає у введенні в ефективній кількості сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, що відносяться до будь-яких варіантів сполук формули (I), (II), (III) або (IV), індивідуумові, що має потребу в цьому. Спосіб можна застосовувати для лікування солідних пухлин шляхом інгібування ангіогенезу.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб інгібування PDGFR- β . Спосіб полягає у введенні в ефективній кількості сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, що відносяться до будь-яких варіантів сполук формули (I), (II), (III) або (IV), індивідуумові, що має потребу в цьому.

Іншим варіантом здійснення винаходу є спосіб інгібування c-Kit. Спосіб полягає у введенні в ефективній кількості сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, що відносяться до будь-яких варіантів сполук формули (I), (II), (III) або (IV), індивідуумові, що має потребу в цьому.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є спосіб інгібування CSF-IR. Спосіб полягає у введенні в ефективній кількості сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, що відносяться до будь-яких варіантів сполук формули (I), (II), (III) або (IV), індивідуумові, що має потребу в цьому.

Прикладом сполуки, яку можна застосовувати в способах у цьому об'єкті винаходу є {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}(4-трифторметилфеніл)амін, що являє собою ефективний інгібітор тирозинкіназних рецепторів VEGFR-2, PDGFR- β , pERK, bFGF, FGFR1, FGFR2,

FGFR3, c-Kit та CSF-IR при оцінці за допомогою біохімічного аналізу. Сполука має інгібуючу активність у відношенні VEGFR-2 (значення IC_{50} 0,07 мкМ), інгібуючу активність у відношенні PDGFR- β (значення IC_{50} 0,0032 мкМ), інгібуючу активність у відношенні c-Kit (значення IC_{50} 0,02 мкМ) і інгібуючу активність у відношенні CSF-IR (значення IC_{50} 0,20 мкМ), що описано в прикладі 87. Крім того, сполука індукувала інгібування ангіогенезу на моделі *in vivo*, отриманій за допомогою матригелю, що видно з Фіг. 13 та описано в прикладі 88.

Даний винахід стане більше зрозумілим шляхом посилання на наведені нижче приклади, які дані тільки для ілюстрації та не призначені на обмеження даного винаходу.

Нижче в прикладах, а також в описі наведені скорочення мають зазначені нижче значення. Поняття, які не визначені, мають загальноприйняті значення

APCI - мас-спектроскопія з хімічною іонізацією при атмосферному тиску

aq. - водний

атм. - атмосфера

см - сантиметр

°C - градуси Цельсія

ДІПЕА - диізопропілетиламін

DMX - 2-хлор-1,3-диметилімідазолінію хлорид

DMCO - диметилсульфоксид

екв. - еквівалент

EtOAc - етилацетат

EtOH - етанол

г або гм - грам(и)

год. - година

ВЕРХ- високоефективна рідинна хроматографія

ІПС - ізопропіловий спирт

л - літр

LCAP - площа у відсотках на хроматограмі, отриманій рідинною хроматографією

PX/MS - рідинна хроматографія/мас спектроскопія

M - молярний

MeCN - ацетонітрил

мл - міліметри

NaOMe - метоксид натрію

1-PrOH - 1-пропанол

TEA - триетиламін

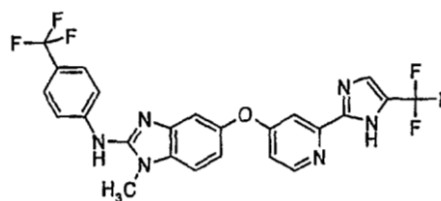
ТФОА - трифтороцтовий ангідрид

ТГФ - тетрагідрофуран

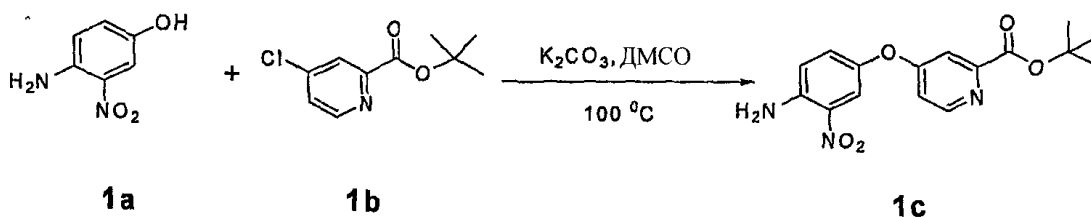
Типові бічні ланцюги, застосовувані в сполуках, які представлені в наступних прикладах, можна одержувати за допомогою описаних нижче процесів.

Приклад 1

Одержання {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)аміну



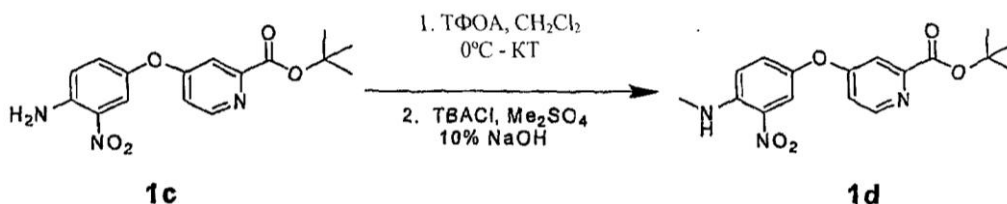
Стадія 1



У тригорлу колбу об'ємом 500 мл, оснащену механічною мішалкою, вносили K_2CO_3 (4,15 г, 30 ммоль). Посудина герметично закривали, відкачували повітря та сушили на полум'ї. Апарату давали остудитися до кімнатної температури та продували аргоном. У реакційну колбу додавали 4-аміно-3-нітрофенол **1a** (3,08 г, 20 ммоль), трет-бутил-4-хлорпіридин-2-карбоксилат **1b** (5,2 г, 24 ммоль) і безводний ДМСО (30 мл). Суміш, що утворилася, інтенсивно перемішували та нагрівали до $100^\circ C$ протягом ~14 год. Реакційну суміш зливали на охолоджений на льоді фосфатний буфер (pH=7) і реакційну колбу ретельно промивали МТБЕ (метил-трет-бутиловий ефір) і водою. Об'єднану двофазну суміш фільтрували через целіт (подушка >2 см). Шари розділяли та відокремлювали, і водну фазу екстрагували МТБЕ

(3×100 мл). Об'єднані органічні шари промивали водою (5×100 мл), сушили ($MgSO_4$) і випарювали. Неочищений залишок адсорбували на SiO_2 та очищали за допомогою експрес-хроматографії (4:1, 2:1, 1:1 гексан-EtOAc (етилацетат)), одержуючи 4,92 г (14,9 ммоль, вихід 74%) сполуки **1c** у вигляді твердої речовини світло-коричневого кольору. 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 8,58 (d, J=5,8 Гц, 1H), 7,90 (d, J=2,8 Гц, 1H), 7,56 (d, J=2,5 Гц, 1H), 7,17 (dd, J=2,8, 8,8 Гц, 1H), 6,94 (dd, J=2,8, 5,8 Гц, 1H), 6,91 (d, J=9,1 Гц, 1H), 6,15 (br s, 2H), 1,62 (s, 9H); ^{13}C ЯМР (75 МГц, $CDCl_3$) δ 165,8, 164,0, 151,8, 151,5, 143,4, 143,2, 131,5, 129,8, 121,0, 118,0, 114,2, 113,1, 83,0, 28,4; $t_{пл}$ $163-166^\circ C$.

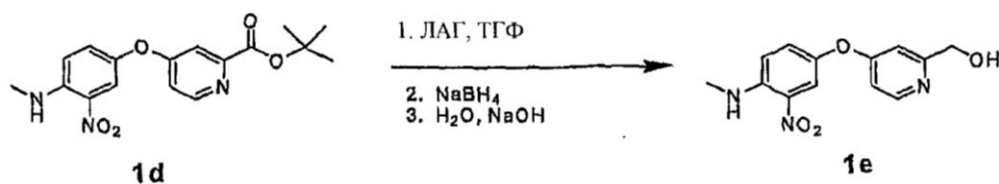
Стадія 2



До розчину нітроаніліну **1c** (5,62 г, 17 ммоль) в CH_2Cl_2 (85 мл) при $0^\circ C$ додавали ТФОА (2,4 мл, 3,6 г, 17 ммоль). Потім охолодну баню видаляли та реакційну суміш витримували при кімнатній температурі протягом 2 год. Реакційну суміш охолоджували до $0^\circ C$ і додавали ТВАСІ (хлорид тетрабутиламонію, 2,5 г, 8,5 ммоль), Me_2SO_4 (диметилсульфат 3,2 мл, 4,3 г, 34 ммоль) і 10% NaOH (34 мл). Суміш, що утворилася, інтенсивно перемішували протягом 4 год. при кімнатній температурі. Реакційну суміш розбавляли водою та шари, що утворилися, розділяли та відокремлювали. Водну фазу екстрагували CH_2Cl_2 (3×100 мл) і об'єднані органічні шари промивали соля-

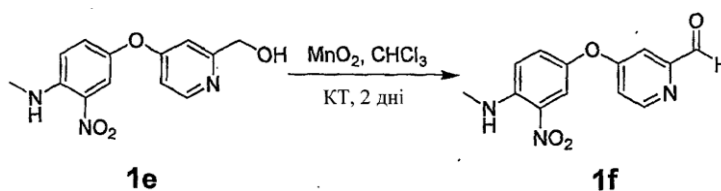
ним розчином (2×100 мл), сушили ($MgSO_4$) і випарювали. Неочищений залишок адсорбували на силікагелі та очищали за допомогою експрес-хроматографії (4:1, 2:1, 1:1, 1:2 гексан/EtOAc), одержуючи 4,5 г (13,0 ммоль, 76%) сполуки **1d** у вигляді твердої речовини світло-жовтогарячого кольору. 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 8,54 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,04 (br d, J=4,7 Гц, 1H), 7,93 (d, J=2,8 Гц, 1H), 7,53 (d, J=2,5 Гц, 1H), 7,25 (app dd, J=2,8, 9,1 Гц, 1H), 6,91 (m, 2H), 3,04 (d, J=4,9 Гц, 3H), 1,59 (s, 9H); ^{13}C ЯМР (75 МГц, $CDCl_3$) δ 165,9, 164,1, 151,5, 144,7, 142,1, 130,4, 118,8, 115,5, 114,1, 112,9, 82,9, 30,4, 28,5; $t_{пл}$ $187-189^\circ C$.

Стадія 3



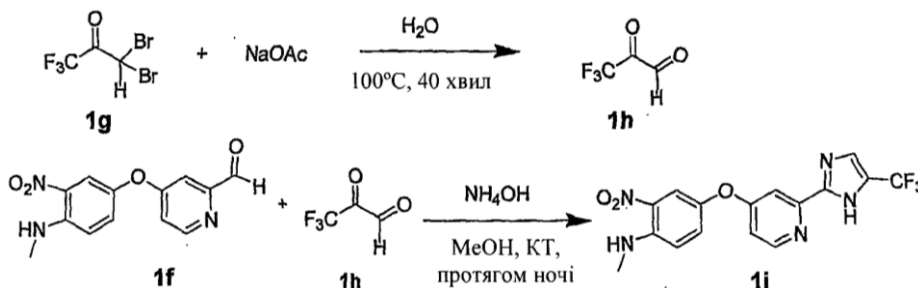
У висушену на полум'ї тригорлу круглодонну колбу об'ємом 500 мл, продуту N_2 , вносили ЛАГ (алюмогідрид літію, 3,0 г, 75 ммоль) і безводний ТГФ (240 мл). Суспензію, що утворилася, охолоджували до $0^\circ C$ і повільно додавали складний трет-бутиловий ефір 1d (20,7 г, 60 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру реакції на рівні нижче $5^\circ C$. Потім реакційну суміш перемішували при $0^\circ C$ протягом 2 год., після чого перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Додавали $NaBH_4$ (2,27 г, 60 ммоль) і реакційну суміш перемішували ще протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після завершення реакції реакційну суміш обробляли, додаючи по краплях послідовно воду (3 мл), 15% $NaOH$ (3 мл) і воду (9 мл).

Стадія 4



У круглодонну колбу об'ємом 100 мл вносили бензиловий спирт 1e (1,38 г, 5,0 ммоль), MnO_2 (6,52 г, 75 ммоль) та $CHCl_3$ (20 мл). Суспензію, що утворилася, перемішували при кімнатній температурі (КТ) протягом 2 днів. Реакційну суміш фільтрували через целіт та тверді частки, що залишилися, промивали послідовно $CHCl_3$ та $EtOH$. Об'єднані органічні фракції випарювали та неочищений залишок, що утворився, адсорбували на силікагелі та очищували за допомогою експрес-хроматографії (98:2 $CH_2Cl_2/MeOH$), одержуючи 790 мг (2,89 ммоль, 58%) органічної твердої речовини жовтогогарячого кольору, що являє собою сполуку 1f. 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 10,01 (s, 1H), 8,64 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,09 (br s, 1H), 7,96 (d, J=2,75 Гц, 1H), 7,37 (d, J=2,48 Гц, 1H), 7,29 (d, J=2,75 Гц, 1H), 7,08 (dd, J=2,47, 5,5 Гц, 1H), 6,94 (d, J=9,35 Гц, 1H), 3,08 (d, J=5,23 Гц, 3H).

Стадія 5



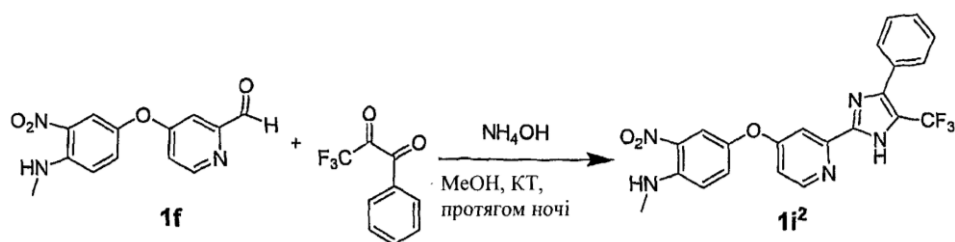
Формування імідазольного кільця (Baldwin J. J., Engelhardt E. L., Hirschmann R., Lundell G. F., Ponticello G. S., J. Med. Chem, 22, 1979, 687): Сполуку 1g (фірма Lancaster (Віндхам, шт. Нью-Гемпшир), 25,75 мл, 136,5 ммоль) додавали до розчину $NaOAc$ (22,4 г, 273 ммоль) у H_2O (60 мл) та розчин, що утворився, нагрівали до $100^\circ C$ протягом 40 хв. Після охолодження до кімнатної температури (КТ), додавали розчин сполуки 1h до суспензії сполуки 1f (25 г, 91 ммоль) у NH_4OH (150 мл) та метанолі (450 мл). Суміш, що утворилася, перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Результати ТШХ (тонкошарова хроматографія, 95:5 $CH_2Cl_2/MeOH$) свідчили про повне вичерпування сполуки 1f. Неочищений продукт концентрували з одержанням водної су-

Суміш, що утворилася, фільтрували через целіт і тверді частки, що залишилися, промивали $EtOAc$ і метанолом. Об'єднані органічні фракції випарювали та неочищений залишок, що утворився, адсорбували на SiO_2 та очищали за допомогою експрес-хроматографії (97:3 $CH_2Cl_2 - MeOH$), одержуючи 7,63 г (27,7 ммоль, 46%) твердої речовини червоно-жовтогогарячого кольору, що являє собою сполуку 1e. 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 8,40 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,05 (br s, 1H), 7,96 (d, J=2,75 Гц, 1H), 7,29 (d, J=2,75 Гц, 1H), 6,92 (d, J=9,35 Гц, 1H), 6,75 (m, 2H), 4,68 (s, 2H), 3,07 (d, J=5,23 Гц, 3H).

спрес-хроматографії (98:2 $CH_2Cl_2/MeOH$), одержуючи 790 мг (2,89 ммоль, 58%) органічної твердої речовини жовтогогарячого кольору, що являє собою сполуку 1f. 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 10,01 (s, 1H), 8,64 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,09 (br s, 1H), 7,96 (d, J=2,75 Гц, 1H), 7,37 (d, J=2,48 Гц, 1H), 7,29 (d, J=2,75 Гц, 1H), 7,08 (dd, J=2,47, 5,5 Гц, 1H), 6,94 (d, J=9,35 Гц, 1H), 3,08 (d, J=5,23 Гц, 3H).

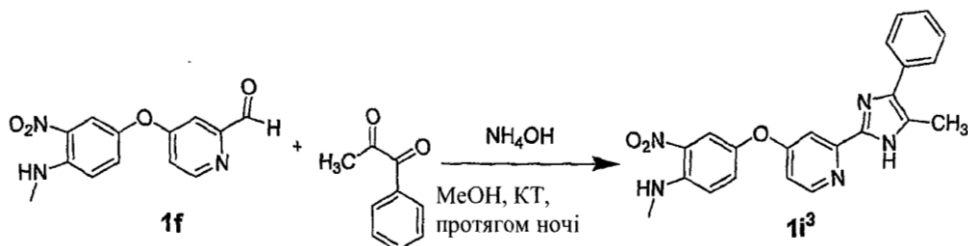
спензії та розділяли за допомогою насиченого Na_2CO_3 та CH_2Cl_2 . Водну фазу тричі екстрагували CH_2Cl_2 та об'єднані органічні фракції промивали соляним розчином, потім сушили ($MgSO_4$) та концентрували, одержуючи 31,6 г сполуки 1i (83 ммоль) у вигляді твердої речовини жовтогогарячого кольору (вихід 91%). Додаткового очищення не було потрібно.

Інші проміжні продукти для одержання заміщених імідазолів можна одержувати аналогічним чином. Наприклад, проміжний продукт 1i² синтезували, здійснюючи стадію 5 з використанням дигідрату 3,3,3-трифтор-1-фенілпропан-1,2-діону замість сполуки 1h, як показано нижче ($MeOH$ = метанол, КТ = кімнатна температура, о/н = протягом ночі, хвил. = хвилини):



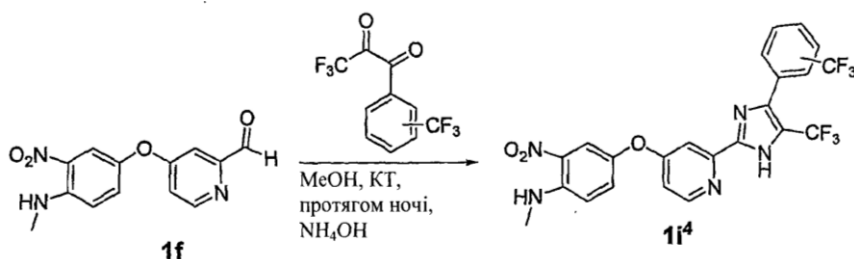
Проміжний продукт $1i^3$ синтезували, здійснюючи стадію 5 з використанням 1-феніл-1,2-

пропандіону замість сполуки 1h, як показано нижче:



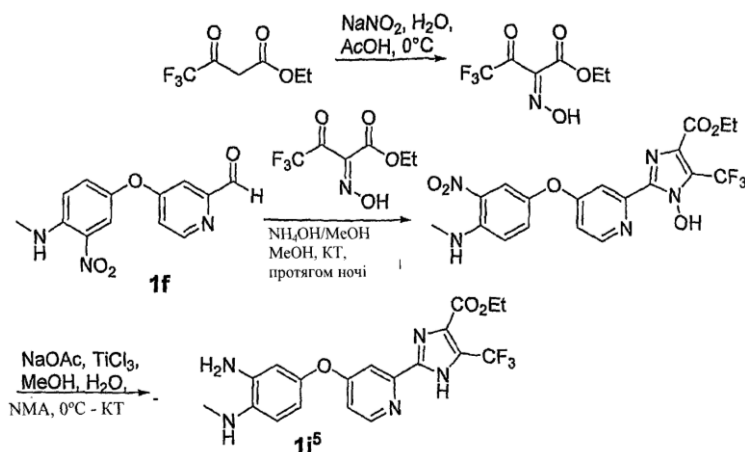
Проміжний продукт $1i^4$ синтезували, здійснюючи стадію 5 з використанням 1-(3-трифторметилфеніл)-1,2-пропандіону або 1-(4-

трифторметилфеніл)-1,2-пропандіону замість сполуки 1h, як показано нижче:

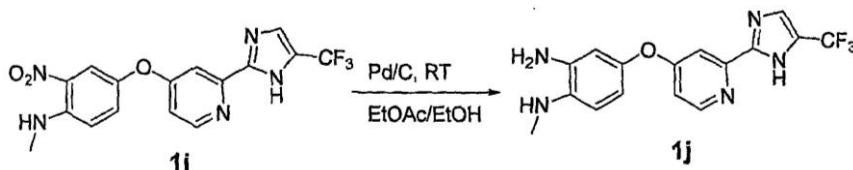


Проміжний продукт $1i^5$ синтезували, здійснюючи стадію 5 разом із процедурами, описаними в US 5374615, з використанням етил-(2Z)-4,4,4-трифтор-2-(гідроксиіміно)-3-оксобутаноата, отри-

маного з етил-4,4,4-трифтор-3-оксобутаноата, замість сполуки 1h, як показано нижче (NMA = N-метилацетамід):



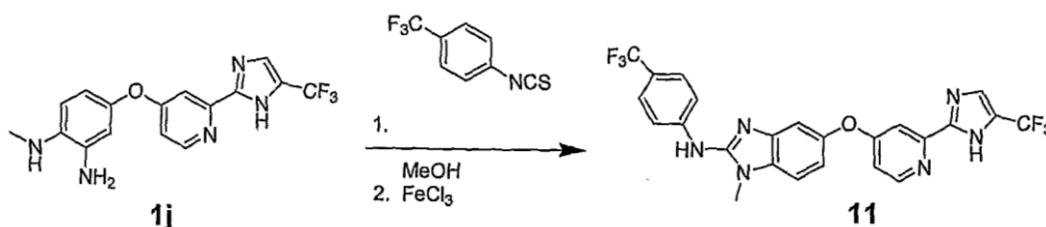
Стадія 6



Суспензію нітроаніліну **1i** (45,76 г, 120 ммоль) в MeOH (220 мл) і EtOAc (200 мл) продували N_2 протягом 20 хвил. і потім у неї вносили суспензію 10% Pd/C (12,77 г, 120 ммоль) в MeOH (60 мл). Реакційну суміш продували H_2 та витримували в атмосфері H_2 протягом 2 днів. Реакційну суміш фільтрували через подушку із целіту та зібрані тверді частки промивали послідовно MeOH та

Стадія 7

EtOAc. Об'єднані органічні фільтрати випарювали, твердий продукт, що утворився, азеотропували з CH_2Cl_2 і потім сушили протягом ночі у вакуумі, одержуючи 40,17 г (115 ммоль) сполуки **1j** у вигляді порошку рудувато-коричневого кольору (вихід 96%). РХ/МС m/z 336,1 (MH^+), R_t = 1,81 хвил.

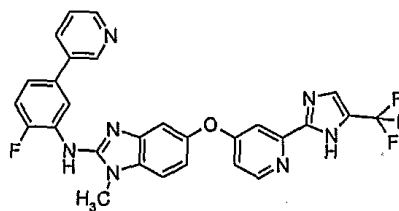


4-Трифторметилфенілізотіоціанат (23,37 г, 115 ммоль) додавали при перемішуванні до розчину діаміну **1j** (40,17 г, 115 ммоль) в MeOH (460 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш витримували при кімнатній температурі протягом 16 год. Після завершення реакції до реакційної суміші додавали розчин $FeCl_3$ (20,52 г, 126,5 ммоль) в MeOH (50 мл) і суміш, що утворилася, перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Неочищену реакційну суміш вносили в ділильну лійку об'ємом 3 л, що містить EtOAc (750 мл) і воду (750 мл). Шари відокремлювали та водну фазу екстрагували EtOAc (водну фазу зберігали). Органічні шари об'єднували, промивали насиченим водним розчином Na_2CO_3 , водою та соляним розчином, потім сушили ($MgSO_4$) і концентрували. Збережену водну фазу підлужували (до $pH=10$) шляхом додавання насиченого водного розчину Na_2CO_3 і суспензію, що утворилася, додавали в ділильну лійку об'ємом 3 л, що містить EtOAc (500 мл). Суміш перемішували та емульсію, що утворилася, фільтрували через фільтрувальний папір, потім шари відокремлювали та водну фазу екстрагували EtOAc (500 мл). Органічні шари об'єднували, промивали соляним розчином, потім сушили ($MgSO_4$), додавали до раніше екстрагованого продукту та концентрували. Об'єднаний продукт розтирали з CH_2Cl_2 (500 мл), адсорбували на SiO_2 та очищали за допомогою експрес-хроматографії. Після завершального розтирання продукту з CH_2Cl_2 одержували {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін у вигляді чистої твердої речовини білого кольору. РХ/МС m/z 519,1 (MH^+);

1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) δ 8,44 (d, $J=5,5$ Гц, 1H), 7,75 (d, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,61 (dd, $J=2,2, 8,5$ Гц, 1H), 7,59 (d, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,56 (d, $J=2,5$ Гц, 1H), 7,38 (app d, $J=8,5$ Гц, 1H), 7,23 (d, $J=1,9$ Гц, 1H), 6,96 (dd, $J=2,2, 8,5$ Гц, 1H), 6,93 (dd, $J=2,5, 5,5$ Гц, 1H), 3,76 (s, 3H); РХ/МС $m/z=519,0$, $R_t=2,57$ хв (MH^+); Аналітично розраховано для $C_{24}H_{16}F_6N_6O$: C 55,6, H 3,11, N 16,21; Виявлено: C 55,81, H 3,43, N 16,42; $t_{пл}$: 217-220°C.

Приклад 2

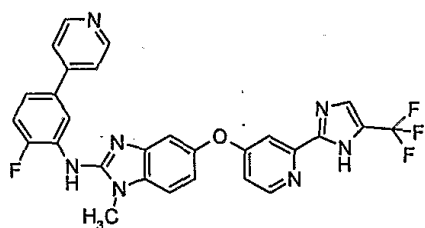
Одержання (2-фтор-5-піридин-3-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}аміну



(2-фтор-5-піридин-3-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 3-(4-фтор-3-ізотіоціанатфеніл)піридину. РХ/МС m/z 546,1 (MH^+), R_t 1,82 хвил.

Приклад 3

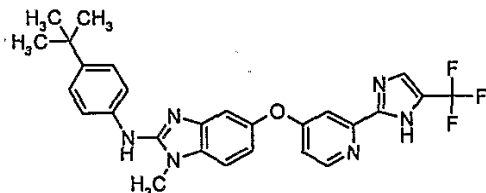
Одержання (2-фтор-5-піридин-4-ілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}аміну



(2-фтор-5-піридин-4-ил-феніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 4-(4-фтор-3-ізотіоціанатфеніл)піридину. РХ/МС m/z 546,5 (MH^+), R_t 1,83 хвил.

Приклад 4

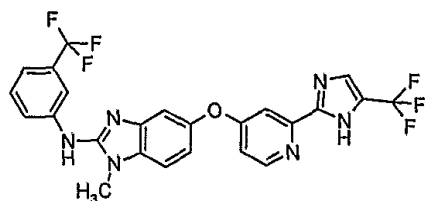
Одержання (4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 4-трет-бутилфенілізотіоціанату. РХ/МС m/z 425,4 (MH^+), R_t 2,56 хвил.

Приклад 5

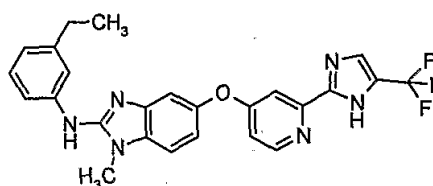
Одержання {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}-(3-трифторметилфеніл)аміну



{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}-(3-трифторметилфеніл)амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 3-(трифторметил)фенілізотіоціанату. РХ/МС m/z 519,4 (MH^+), R_t 2,36 хвил.

Приклад 6

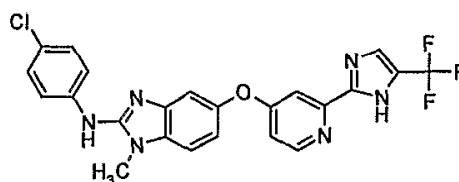
Одержання (3-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(3-Етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 3-етилфенілізотіоціанату. РХ/МС m/z 479,4 (MH^+), R_t 2,32 хвил.

Приклад 7

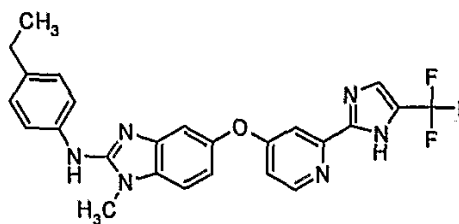
Одержання (4-хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(4-Хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 4-хлорфенілізотіоціанату. РХ/МС m/z 485,4 (MH^+), R_t 2,23 хвил.

Приклад 8

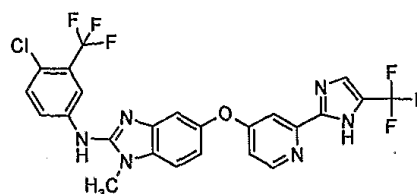
Одержання (4-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(4-Етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 4-етилфенілізотіоціанату. РХ/МС m/z 479,5 (MH^+), R_t 2,31 хвил.

Приклад 9

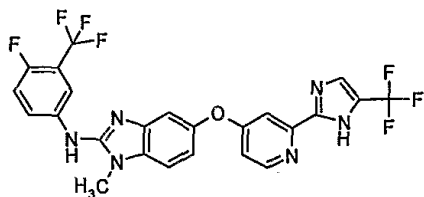
Одержання (4-хлор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(4-Хлор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 4-хлор-3-(трифторметил)феніл-ізотіоціанату. $PX/MS\ m/z$ 553,4 (MH^+), R_t 2,51 хвил.

Приклад 10

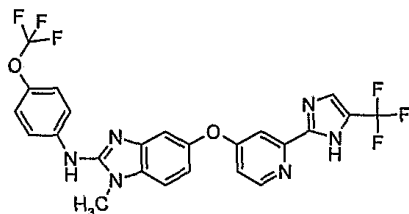
Одержання (4-фтор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(4-Фтор-3-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 4-фтор-3-(трифторметил)феніл-ізотіоціанату. $PX/MS\ m/z$ 537,4 (MH^+), R_t 2,40 хвил.

Приклад 11

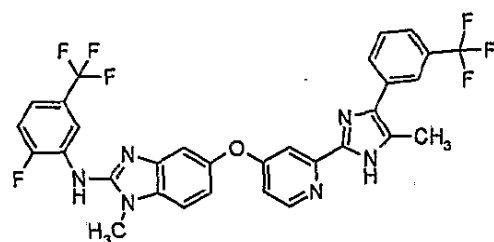
Одержання {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметоксифеніл)аміну



{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметоксифеніл)амін синтезували відповідно до способу, описаного на стадії 7 прикладу 1, з використанням 4-(трифторметокси)феніл-ізотіоціанату. $PX/MS\ m/z$ 535,4 (MH^+), R_t 2,24 хвил.

Приклад 12

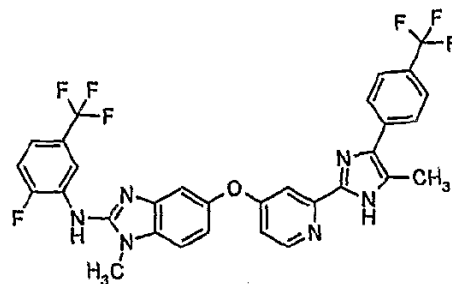
Одержання (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-[5-метил-4-(3-трифторметилфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-[5-метил-4-(3-трифторметилфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного вище в прикладі 1, з використанням 2-фтор-5-(трифторметил)феніл-ізотіоціанату. $PX/MS\ m/z$ 627,5 (MH^+), R_t 2,79 хвил.

Приклад 13

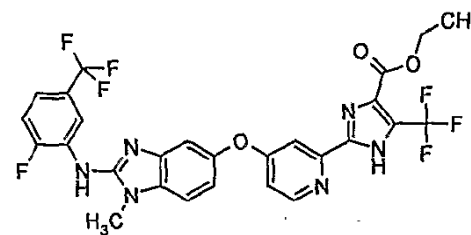
Одержання (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-[5-метил-4-(4-трифторметилфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}аміну



(2-Фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-[5-метил-4-(4-трифторметилфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}амін синтезували відповідно до способу, описаного вище в прикладі 1, з використанням 2-фтор-5-(трифторметил)феніл-ізотіоціанату. $PX/MS\ m/z$ 627,5 (MH^+), R_t 2,79 хвил.

Приклад 14

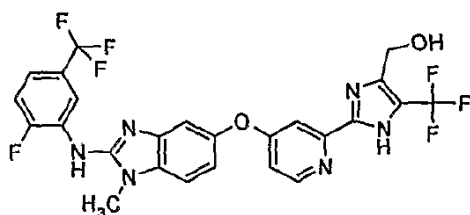
Одержання етилового ефіру 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1Н-імідазол-4-карбонової кислоти



Етиловий ефір 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1Н-імідазол-4-карбонової кислоти синтезували відповідно до способу, описаного вище в прикладі 1, з використанням 2-фтор-5-(трифторметил)феніл-ізотіоціанату. $PX/MS\ m/z$ 609,5 (MH^+).

Приклад 15

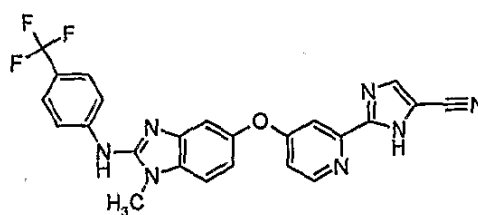
Одержання (2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1Н-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1Н-імідазол-4-іл)метанолу



Red-Al (гідрид натрійбіс(2-метоксиетокси)алюмінію, 65 мас. % у толуолі, 0,1 мл) додавали по краплях до розчину етилового ефіру 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1H-імідазол-4-карбоної кислоти (0,0104 г, 0,017 ммоль) у толуолі. Починалося бурхливе виділення газу та через 20 хвил. реакцію припиняли за допомогою H_2O , NaOH і здійснювали екстракцію за допомогою EtOAc. Органічний шар промивали H_2O , сушили над Na_2SO_4 , фільтрували та концентрували, одержуючи 5,9 мг неочищеного 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1H-імідазол-4-іл)метанолу, що потім очищали за допомогою ОФ-ВЕРХ (ВЕРХ зі оберненою фазою), у результаті чого одержували 1,1 мг чистої сполуки (чистота 98%). PX/MC m/z 567,1 (MH^+), R_t 2,40 хвил.

Приклад 16

Одержання 2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-карбонітрилу



Суспензію {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)аміну одержували відповідно до способу, описаного в прикладі 1 (1,83 г, 3,4 ммоль), та 28% NH_4OH (23 мл) в MeOH (10 мл) поміщали в пробірку, герметично закривали та нагрівали до $140^\circ C$ протягом 3 год. Після того, як по даним PX/MC реакція була закінчена, неочищену реакційну суміш вносили в ділительну лійку та розділяли в суміші EtOAc (50 мл) та води (50 мл). Шари відокремлювали та водну фазу екстрагували EtOAc (2×50 мл). Органічні шари об'єднували, промивали соляним розчином, потім сушили ($MgSO_4$) і концентрували. Неочищений продукт адсорбували на SiO_2 та очищали за допомогою експрес-хроматографії, одержуючи 2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-карбонітрил у вигляді твердої речовини білого кольору. PX/MC m/z 476,1 (MH^+).

Приклади 17-59a

Сполуки, представлені в таблиці 1 (приклади 17-59a), одержували відповідно до процедур, описаних у прикладах 1-16. Різні вихідні продукти, використовувані в синтезі сполук, повинні бути відомі фахівцям в даній галузі (див., наприклад, Tordeux M., Langlois B., Wakselman C., J Chem Soc. Perkin Trans 1, 1990, с. 2293).

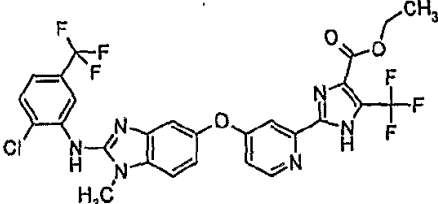
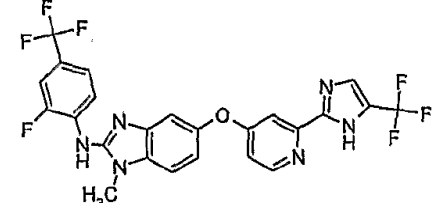
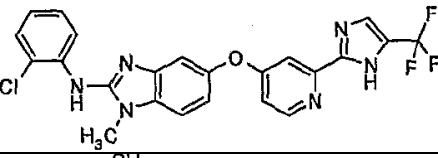
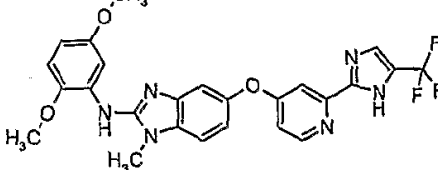
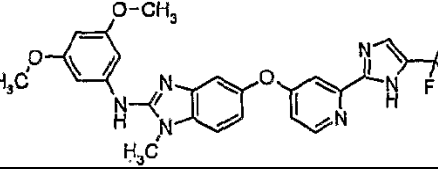
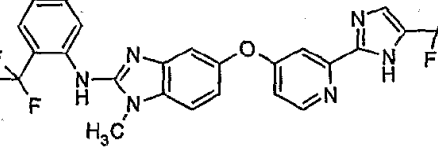
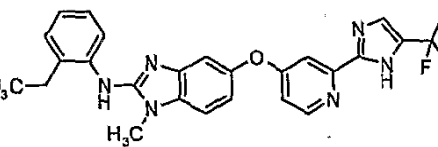
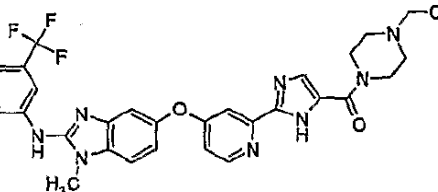
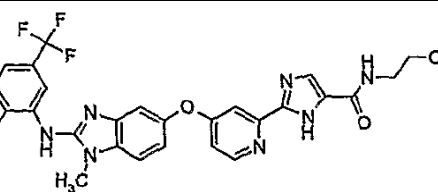
Таблиця 1

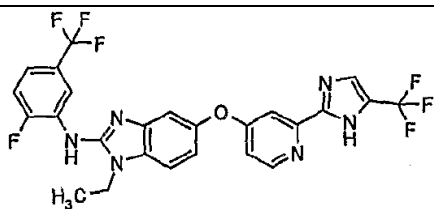
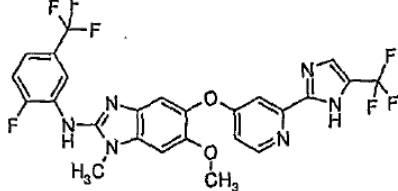
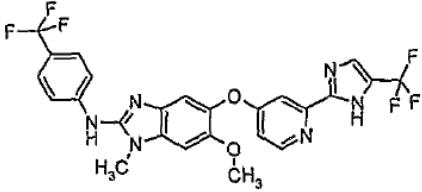
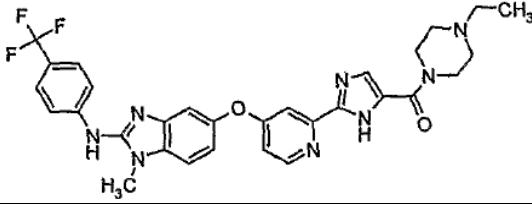
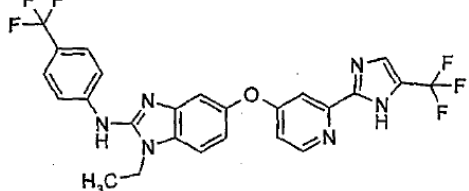
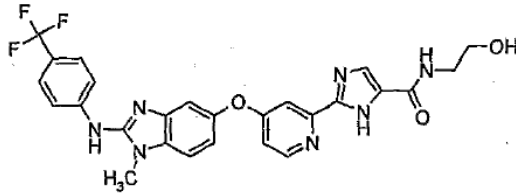
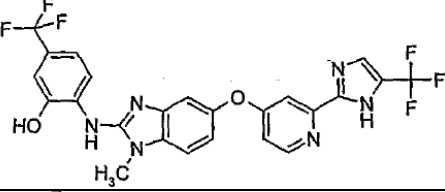
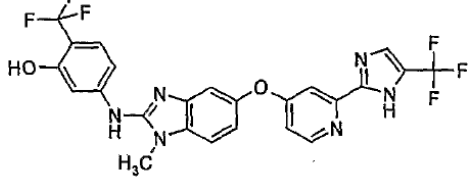
Приклад	Структура	Назва	MH^+
17		(3-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-феніл-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	515,4
18		{1-метил-5-[2-(5-феніл-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-1-іл}-(4-трифторметилсульфанілфеніл)амін	559,3
19		(3-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	507,1

20		[4-фтор-3-(тетрагідрофуран-3-іл)феніл]-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	539,3
21		(4-бромфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	529,1
22		(4-фтор-3-ізопропілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	511,3
23		{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилсульфанілфеніл)амін	551,2
24		(2-фтор-5-ізопропілфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	511,1
25		(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	537,0
26		(5-трет-бутил-2-фторфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	525,1
27		(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	483,1

28		(2-хлор-4-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	553,0
29		2-(4-[2-фтор-5-трифторметилфеніламіно]-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл)-3H-імідазол-4-карбонітрил	494,1
30		(5-трет-бутил-2-хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	541,1
31		(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	613,1
32		(2-хлор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	629,0
33		{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(3-трифторметилфеніл)амін	529,1
34		(3-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	555,1
35		(4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(4-феніл-5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	583,2

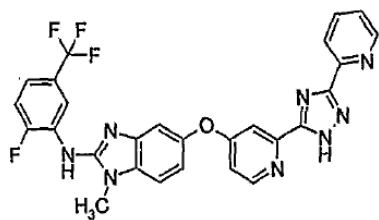
36		(2-хлор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	553,1
37		(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	559,1
38		(2-хлор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	575,1
39		(4-трет-бутилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	529,3
40		{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(3-трифторметилфеніл)амін	541,2
41		(5-трет-бутил-2-фторфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-метил-4-феніл-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	547,2
42		[4-(4-метилпіперазин-1-іл)феніл]-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	549,2
43		метиловий ефір 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-карбонової кислоти	527,1

44		етиловий ефір 2-{4-[2-(2-хлор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-5-трифторметил-1H-імідазол-4-карбонової кислоти	625,0
45		(2-фтор-4-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	537,1
46		(2-хлорфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	485,1
47		(2,5-диметоксифеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	511,1
48		(3,5-диметоксифеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	511,2
49		{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(2-трифторметилфеніл)амін	519,1
50		(2-етилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	479,2
51		(4-етилпіперазин-1-іл)-(2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-іл)метанон	609,2
52		(2-гідроксиетил)амід 2-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-карбонової кислоти	556,1

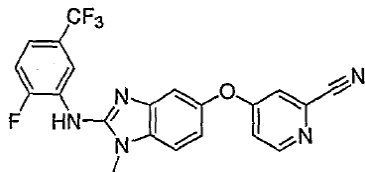
53		{1-етил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(2-фтор-5-трифторметилфеніл)амін	551,1
54		(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{6-метокси-1-метил-5-[2-(трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	567,4
55		{6-метокси-1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін	549,4
56		(4-етилпіперазин-1-іл)-(2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-іл)метанол	592,2
57		{1-етил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін	533,1
58		(2-гідроксиетил)амід 2-{4-[1-метил-2-(4-трифторметилфеніламіно)-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-3H-імідазол-4-карбонової кислоти	538,1
59		2-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-ідаміно}-5-трифторметилфенол	535,3
59a		3-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іламіно}-6-трифторметилфенол	535,3

Приклад 60

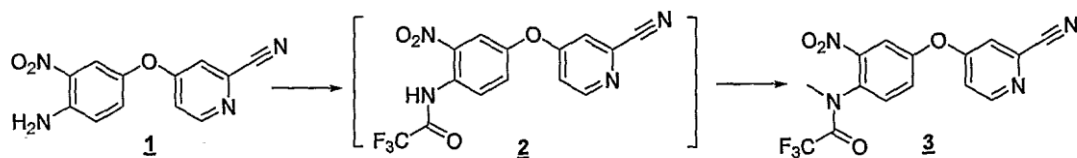
Одержання (2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-піридин-2-іл-2H-[1,2,4]триазол-3-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}аміну



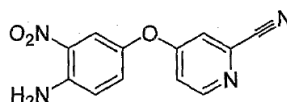
Одержання 4-[2-(2-фтор-5-трифторфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-карбонітрилу



Стадія 1. Синтез 4-(4-аміно-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонітрилу:



Карбонат калію (1,6 г) сушили у вакуумі при нагріванні, охолоджували до кімнатної температури та суспендували в дихлорметані (30 мл) разом з 4-(4-аміно-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонітрилом (2,0 г) у атмосфері азоту. Продукт охолоджували до 0°C і додавали трифтороцтовий ангідрид (2,2 мл), чистий. Після додавання вихідний матеріал швидко переходив у розчин. Після витримання протягом 10 хвил. при 0°C суміш розбавляли дихлорметаном, промивали (H₂O, водний розчин NaCl), сушили (K₂CO₃), фільтрували та десорбували до одержання піни жовтого кольору. $m/z=353$ (M+1). Цей продукт застосовували без очищення. До суспензії карбонату калію (1,858 г) у диметилформаміді (ДМФА) (30 мл, що містить сполуку 2, ~7,8 ммоль) в атмосфері азоту додавали йодметан (0,53 мл). Суспензію перемішували при кімнатній температурі протягом ночі, потім зливали на H₂O (300 мл), екстрагували (Et₂O, 3×150 мл), об'єднані екстракти промивали (H₂O, водний розчин NaCl), сушили (карбонат калію), фільтрували та десорбували до одержання масла жовтогогарячого кольору (7,4922

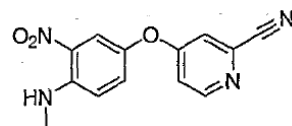


Карбонат калію (9 г) сушили у вакуумі при нагріванні, охолоджували до кімнатної температури в атмосфері азоту. Додавали 4-аміно-3-нітрофенол (3,4 г), 4-хлор-2-ціанопіридин (3,0 г) і диметилсульфоксид (30 мл, безводний). Систему перемішували в атмосфері азоту, нагріваючи до 103°C, і витримували при цій температурі протягом 1 год. Потім реакційну суміш охолоджували до КТ, виливали на лід/H₂O (500 мл), збирали осад, промивали (H₂O), розчиняли (EtOAc), сушили (Na₂SO₄), фільтрували та десорбували до одержання твердої речовини. Її суспендували (Et₂O), збирали, сушили на повітрі, одержуючи 4,1 г (73,5%) і збирали другу партію (0,55 г, 10%). $m/z=257$ (M+1).

Стадія 2. Синтез N-[4-(2-ціанопіридин-4-ілокси)-2-нітрофеніл]-2,2,2-трифтор-N-метилацетаміду:

г). $m/z=367$ (M+1).

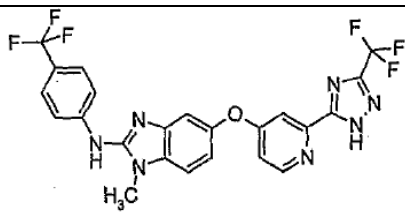
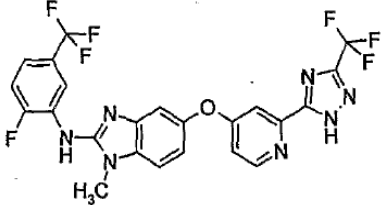
Стадія 3. Синтез 4-(4-метиламіно-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонітрилу:



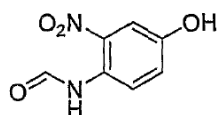
NaOH (1 мл, 1н. водний розчин) додавали по краплях до розчину N-[4-(2-ціанопіридин-4-ілокси)-2-нітрофеніл]-2,2,2-трифтор-N-метилацетаміду (сполука 3, 440 мг) в етанолі (6 мл) при кімнатній температурі. Через 40 хвил. суміш розбавляли H₂O (20 мл) і охолоджували до 0°C. Збирали кристали яскраво жовтогогарячого кольору, промивали (H₂O) та сушили на повітрі, одержуючи 311,1 мг (94%). $m/z=271$ (M+1)

Стадія 4. Синтез 4-[2-(2-фтор-5-трифторфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-карбонітрилу:

Приклад	Структура	Назва	MH ⁺
61		(5-{4-[2-(2-фтор-5-трифторметилфеніламіно)-1-метил-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-іл}-1H-[1,2,4]триазол-3-іл)ацетонітрил	509,2
62		(5-{2-[5-(4-етилпіперазин-1-іл-метил)-2H-[1,2,4]триазол-3-іл]-піридин-4-ілокси}-1-метил-1H-бензімідазол-2-іл)-(2-фтор-5-трифторметилфеніл)амін	596,2

63		{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-2H-[1,2,4]триазол-3-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін	520,2
64		(2-фтор-5-трифторметилфеніл)-{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-2H-[1,2,4]триазол-3-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}амін	538,2

Приклад 65
Одержання
нітрофеніл)формаміду



N-(4-гідрокси-2-нітрофеніл)формамід можна одержувати відповідно до наступної процедури:

1. Збирають пристрій, що включає 5-горлу реакційну колбу об'ємом 3 л, оснащену датчиком для вимірювання внутрішньої температури, терморегулятором, нагрівальним кожухом, конденсатором, механічною мішалкою, краплинною лішкою об'ємом 1 л і впускним клапаном для азоту. Реактор продувають азотом протягом 5 хв.

2. У колбу вносять оцтовий ангідрид (245 мл). Перемішують в атмосфері азоту.

3. Вносять у вигляді однієї порції мурашину кислоту (125 мл) (при перемішуванні відбувається виділення тепла та реакція між оцтовим ангідридом і мурашиною кислотою).

4. Встановлюють кінцеве значення внутрішньої температури (ВТ), рівне 60°C та починають нагрівання. Після того, як ІТ досягне 60°C, проводять перемішування та витримують ще протягом 2 год.

5. Охолоджують вміст за допомогою льодяної бані.

6. Після того, як ВТ досягне температури навколишнього середовища (приблизно 20°C), починають додавання розчину 4-аміно-3-нітрофенолу (160 г) у 700 мл безводного ТГФ (тетрагідрофуран) за допомогою краплинної лішки об'ємом 1 л частинами таким чином, щоб ВТ не перевищувала 40°C. Продукт починає осаджуватися у вигляді твердої речовини жовтого кольору.

7. Після завершення додавання крижану баню заміняють нагрівальним кожухом. Встановлюють кінцеве значення ВТ на рівні 60°C і починають нагрівання.

8. Здійснюють моніторинг проходження реакції за допомогою ВЕРХ. Як правило, реакція займає менш 1 год.

9. Коли площа, що відповідає вихідному продукту, становить <1%, додають 500 мл води. Охолоджують до кімнатної температури за допо-

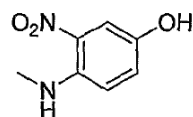
N-(4-гідрокси-2-

мого льодяної бані.

10. Збирають продукт шляхом вакуумної фільтрації. Промивають осад на фільтрі за допомогою 3×200 мл води. Сушать на повітрі, а потім сушать у печі при 50°C у вакуумі (тиск 27 дюймів рт. стовп.) при обережному продуванні струменем повітря або азоту до досягнення постійної маси.

Приклад 66

Одержання 4-метиламіно-3-нітрофенолу



4-метиламіно-3-нітрофенол можна одержувати відповідно до наступної процедури:

1. Збирають пристрій, що включає 3-горлу реакційну колбу об'ємом 500 мл, оснащену датчиком для вимірювання внутрішньої температури та впускним клапаном для азоту. Реактор продувають азотом протягом 5 хв.

2. У реактор вносять N-(4-гідрокси-2-нітрофеніл)формамід (5 г) і безводний ТГФ (100 мл). Перемішують в атмосфері N₂, одержуючи суспензію жовтого кольору.

3. За допомогою шприца повільно додають діетилетерат-трифториду бору (3,83 мл).

4. Перемішують реакційну суміш протягом 30 хв. при кімнатній температурі.

5. Додають порцію натрію (1,04 г).

6. Перемішують реакційну суміш протягом 1 год. і після цього через кожну годину здійснюють моніторинг проходження реакції за допомогою ВЕРХ (як правило, реакція займає 3 год.).

7. Коли за даними ВЕРХ у зразку залишається менш 1,0% вихідного продукту, за допомогою шприца повільно додають 1M HCl (40 мл) протягом періоду часу, що становить 10 хв.

8. Перемішують протягом 60 хв.

9. За необхідності додають за допомогою шприца 1M NaOH для доведення значення pH до 7±0,5.

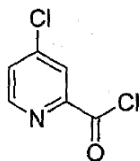
10. Зливають реакційну суміш у круглодонну колбу об'ємом 500 мл і концентрують при зниженому тиску (20 мм рт. стовп. при 25°C) до видалення приблизно 100 мл прозорої рідини.

11. Додають воду (100 мл) у реакційну посудину. Охолюють до $0 \pm 2^\circ\text{C}$ при перемішуванні. Продукт осаджується у вигляді твердої речовини червоного кольору.

12. Збирають продукт шляхом вакуумної фільтрації через лійку із грубою фриттою. Промивають осад на фільтрі водою (2×20 мл). Сушать на повітрі, а потім сушать у печі при $50^\circ\text{C}/27$ дюймах рт. стовп. до досягнення постійної маси. Зразки передають для аналізу.

Приклад 67

Одержання 4-хлорпіридин-2-карбонілхлориду



4-хлорпіридин-2-карбонілхлорид можна одержувати відповідно до наступної процедури.

1. Збирають пристрій, що включає 5-горлу реакційну колбу об'ємом 5 л, оснащену датчиком для вимірювання внутрішньої температури (ВТ), терморегулятором, нагрівальним кожухом, конденсатором, механічною мішалкою, впускним клапаном для азоту, випускним газовим клапаном згори конденсатору, що з'єднаний з 2-горлим відділювачем рідини об'ємом 2 л, що у свою чергу з'єднаний зі скруббером об'ємом 12 л, заповненим приблизно 6 л 8М розчину NaOH, що перемішують магнітною мішалкою. Продувають реактор азотом протягом 5 хвил. і потім відключають потік азоту.

2. У реактор вносять тіонілхлорид (1,18 л), а потім бромід калію (38,4 г) при перемішуванні з невеликою швидкістю (приблизно 200 об./хвил.).

3. У реактор вносять піколінову кислоту (397 г).

4. Встановлюють кінцеве значення ВТ на рівні 80°C і починають нагрівання.

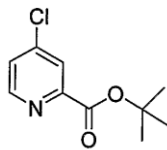
5. Беруть зразки та здійснюють моніторинг проходження реакції за допомогою ВЕРХ. Як правило, реакція протікає протягом приблизно 14 год. Продовження нагрівання може приводити до підвищеного дихлорування.

6. Коли здається, що реакція закінчилася (у реакційній суміші присутньо менше 1% піколінової кислоти), нагрівання припиняють. Видаляють нагрівальний кожух.

7. Після зниження ВТ до рівня нижче 30°C рідину переносять у реакційну колбу об'ємом 3 л. Реактор об'ємом 5 л промивають 700 мл толуолу. Змиви переносять у колбу об'ємом 3 л. Видаляють надлишок SOCl_2 та толуолу при зниженому тиску. Повторюють процес із використанням 2×700 мл толуолу. Повністю видаляють розчинник, одержуючи тверду речовину жовто-жовтогогарячого кольору. До реакційної суміші додають толуол (400 мл). Суміш, що утворилася, використовують на наступній стадії.

Приклад 68

Одержання трет-бутилового ефіру 4-хлорпіридин-2-карбонової кислоти



Трет-бутиловий ефір 4-хлорпіридин-2-карбонової кислоти можна одержувати відповідно до наступної процедури:

1. Забезпечують круглодонну колбу (4-горлу) об'ємом 12 л механічною мішалкою та термометром.

2. У реактор вносять толуол (1 л), піридин (977,7 г) і ди-трет-бутилдикарбонат $(\text{BOC})_2\text{O}$ (855,5 г).

3. Охолюють реактор до досягнення внутрішньої температури 0°C .

4. У реактор додають 4-хлорпіридин-2-карбонілхлорид (686 г) з такою швидкістю, щоб внутрішня температура реакції підтримувалася на рівні нижче 5°C .

5. Реакційній суміші дають повільно нагрітись до кімнатної температури ($\sim 20^\circ\text{C}$) і перемішують протягом 16 год.

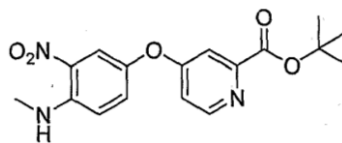
6. Коли на основі результатів ВЕРХ визнано, що реакція закінчилася (площа, що відповідає вихідному продукту, становить $<0,5\%$), реакційну суміш промивають водою (2×4 л), потім 1М розчином HCl (2×2 л).

7. Реакційну суміш концентрують при зниженому тиску для видалення толуолу та залишку піридину.

8. Додають толуол (500 мл) і потім реакційну суміш концентрують при зниженому тиску, одержуючи необхідний продукт.

Приклад 69

Одержання трет-бутилового ефіру 4-(4-метиламіно-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонової кислоти



Трет-бутиловий ефір 4-(4-метиламіно-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонової кислоти можна одержувати відповідно до наступної процедури:

1. Забезпечують круглодонну колбу об'ємом 3 л механічною мішалкою, термометром і впускним клапаном для азоту.

2. У реактор вносять K_2CO_3 (123 г).

3. Реакційну посудину заповнюють інертним газом.

4. У реактор вносять 4-метиламіно-3-нітрофенол (100 г), трет-бутиловий ефір 4-хлорпіридин-2-карбонової кислоти (127 г) і безводний ДМСО (1 л).

5. Реакційну суміш інтенсивно перемішують і нагрівають до 100°C .

6. Коли на основі результатів ВЕРХ визнано,

що реакція закінчилася (площа, що відповідає трет-бутиловому ефіру 4-хлорпіридин-2-карбонової кислоти становить <0,5%), гарячу реакційну суміш зливають при перемішуванні на холодну воду (об'єм 3 л).

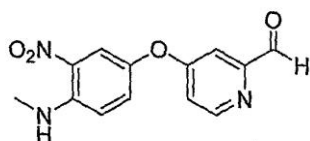
7. Виділяють за допомогою фільтрації необхідну сполуку у вигляді твердої речовини оранжево-коричневого кольору.

8. Промивають виділену тверду речовину водою (2×200 мл), а потім гептаном (2×200 мл).

9. Сушать продукт у вакуумній печі при 45-50°C до досягнення постійної маси.

Приклад 70

Одержання 4-(4-(метиламіно)-3-нітрофенокси)піридин-2-карбальдегіду



4-(4-(Метиламіно)-3-нітрофенокси)піридин-2-карбальдегід можна одержувати відповідно до наступної процедури:

1. Забезпечують круглодонну колбу об'ємом 1000 мл впускним клапаном для азоту, механічною мішалкою та термометром.

2. У реактор вносять трет-бутиловий ефір 4-(4-метиламіно-3-нітро-фенокси)піридин-2-карбонової кислоти (10 г) через лійку для сипучих речовин.

3. Додають 2-метил-ТГФ (100 мл) через лійку для сипучих речовин.

4. Охолоджують реактор до досягнення внутрішньої температури -25°C.

5. Додають DIBAL (гідрид діізобутилалюмінію, 1,5M у толуолі; 72 мл) через краплинну лійку з такою швидкістю, щоб підтримувати внутрішню температуру на рівні -15°C.

6. Аналізують проходження реакції за допомогою ВЕРХ або ГХ (газова хроматографія), контролюючи зникнення ефіру.

7. Перемішують реакційну суміш при -20°C, здійснюючи моніторинг через кожну годину.

8. Якщо через 2 год. реакція перестає протікати, то додають ще 0,5 екв. DIBAL (гідрид діізобутилалюмінію) і здійснюють моніторинг реакції. Повторюють цю стадію до поглинання всього ефіру.

9. Після завершення реакції її повільно припиняють шляхом додавання MeOH (10 мл).

10. Додають виннокислий калій-натрій (40 г) до 200 мл води та перемішують до розчинення.

11. Додають водний розчин до реакційної суміші та дають нагрітися до КТ.

12. Додають 2-метил-ТГФ (100 мл) у реакційну посудину.

13. Нагрівають при перемішуванні реакційну суміш до 50°C протягом 1 год.

14. Дають розділитися фазам.

15. Видаляють нижній водний шар.

16. Фільтрують органічний шар через пробку із целіту.

17. Промивають целіт 2-метил-ТГФ (2×50

мл).

18. Вносять реакційну суміш у круглодонну колбу об'ємом 500 мл.

19. Концентрують реакційну суміш шляхом дистиляції до об'єму ~50 мл.

20. Охолоджують реакційну суміш при перемішуванні до 0°C.

21. Перемішують реакційну суміш протягом 1 год. при 0°C.

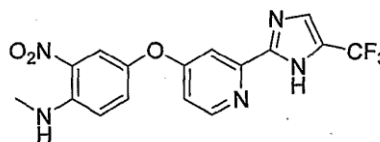
22. Фільтрують реакційну суміш через фільтр із грубої фрітти.

23. Дають твердим часткам висохнути на фільтрі протягом періоду часу від 30 хвил. до 1 год.

24. Аналізують тверді частки за допомогою ГХ та ЯМР, визначаючи % спирту, за необхідності для видалення спиртових домішок суспендують у метанолі при 30°C протягом 1 год. (5 мл метанолу на 1 г сполуки).

Приклад 71

Одержання 4-(2-(5-(трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N-метил-2-нітробензоламіну



4-(2-(5-(Трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N-метил-2-нітробензамін можна одержати відповідно до наступної процедури:

1. Забезпечують круглодонну колбу (3-х горлу) об'ємом 2 л механічною мішалкою, датчиком для вимірювання внутрішньої температури, терморегулятором і конденсатором.

2. У реактор вносять воду (590 мл) через лійку для сипучих речовин.

3. Починають перемішувати суміш та у реактор вносять ацетат натрію (240 г).

4. Промивають колбу, використовувану для внесення ацетату натрію, водою (30 мл).

5. Нагрівають реакційну суміш до 50°C.

6. Додають порціями 3,3-дибром-1,1,1-трифторпропан-2-он (395 г) при 50°C, підтримуючи внутрішню температуру реакційної суміші на рівні нижче 100°C.

7. Нагрівають реакційну суміш до внутрішньої температури 100°C.

8. Після перемішування реакційної суміші протягом 1 год. при 100°C відбирають зразок для аналізу.

9. Температуру реакційної суміші підтримують на рівні 100°C доти, поки кількість вихідного продукту не стане <1,5%.

10. Після завершення реакції реакційну суміш охолоджують до температури <65°C.

11. Після охолодження реакційної суміші круглодонну колбу (4-х горлу, оснащену кожухом) об'ємом 5 л забезпечують датчиком для вимірювання внутрішньої температури, терморегулятором та механічною мішалкою.

12. Вносять у реактор об'ємом 5 л етилацетат (500 мл) через лійку для сипучих речовин та

починають перемішування.

13. Вносять у реактор об'ємом 5 л 4-(4-(метиламіно)-3-нітрофенокси)піридин-2-карбальдегід (200 г) через лійку для сипучих речовин.

14. Промивають лійку для сипучих речовин етилацетатом (200 мл) і змиви вносять у реактор об'ємом 5 л.

15. Вносять у реактор об'ємом 5 л 95%-ний етанол (1,3 л).

16. Переносять пірувальдегідну реакційну суміш із реактора об'ємом 2 л у реактор об'ємом 5 л. У цей момент часу температура становить ~35°C.

17. Повільно додають порціями концентрований NH_4OH (1,3 л), здійснюючи моніторинг температури. Реакція є екзотермічною, тому перші 500 мл слід додавати порціями, підтримуючи внутрішню температуру на рівні нижче 50°C. Загальний час додавання становить ~25 хвил. Підвищена температура приводить до почервоніння кінцевого продукту.

18. Нагрівають реактор об'ємом 5 л до 50°C.

19. Перемішують реакційну суміш при 50°C. У цей момент часу розчин, як правило, має червоно-жовтогарячий колір.

20. Здійснюють моніторинг реакції через кожну годину до завершення реакції.

21. Коли визначено, що реакція закінчилася, реакційну суміш охолоджують до 0°C протягом 2 год.

22. Виділяють продукт шляхом фільтрації через грубий фільтр зі спеченого скла.

23. Промивають реактор холодним етанолом (150 мл). Змив переносять на фільтр.

24. Вносять у реактор об'ємом 5 л воду (2 л).

25. Перемішують та охолоджують реактор до 10°C.

26. Переносять вологий осад з фільтра в реактор об'ємом 5 л.

27. Перемішують при 10°C протягом 60 хвил.

28. Фільтрують продукт через грубий фільтр зі спеченого скла.

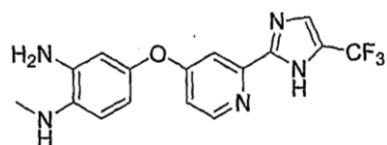
29. Промивають реактор водою (250 мл). Змив переносять на фільтр.

30. Сушать вологий осад на фільтрі протягом 1 год.

31. Переносять продукт у круглодонну колбу (одногорлу) об'ємом 2 л та обробляють досуха в барабані за допомогою роторного випарника при температурі бані 45°C до досягнення постійної маси.

Приклад 72

Одержання 4-(2-(5-(трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N1-метилбензол-1,2-діаміну



4-(2-(5-(трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N1-метилбензол-1,2-діамін

можна одержувати відповідно до наступної процедури:

1. Забезпечують круглодонну колбу (4-х горлу) об'ємом 2 л механічною мішалкою, датчиком для вимірювання внутрішньої температури, терморегулятором, пристроєм для продувки азотом і парціальним конденсатором гарячого зрошення.

2. Вносять у реактор EtOH (125 мл) через лійку для сипучих речовин. Починають швидко перемішувати.

3. Вносять у реактор 4-(2-(5-(трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N-метил-2-нітробензоламін (50 г) через лійку для сипучих речовин.

4. Нагрівають реакційну суміш до 50°C.

5. Під час нагрівання реакційної суміші в колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл вносять воду (75 мл) через лійку для сипучих речовин. Починають швидко перемішувати.

6. Вносять у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл 3,0 екв. карбонату натрію (41,92 г) через лійку для сипучих речовин.

7. Перемішують суміш до розчинення всіх твердих часток.

8. Коли температура суспензії досягне 50°C, переносять суміш, що містить карбонат натрію, із колби Ерленмейєра об'ємом 250 мл у реакційну суміш через лійку для сипучих речовин.

9. Вносять у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл воду (75 мл) через лійку для сипучих речовин. Починають швидко перемішувати.

10. Вносять у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл 1,0 екв. дитіоніту натрію (22,95 г) через лійку для сипучих речовин, після чого відразу додають у реакційну колбу.

11. Швидко перемішують тверді частки доти, поки не розчиниться їх більша частина.

12. Швидко переносять суміш, що містить дитіоніт натрію, із колби Ерленмейєра об'ємом 250 мл у реакційну суміш через лійку для сипучих речовин.

13. Перемішують реакційну суміш при 50°C протягом 30 хвил.

14. Вносять у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл воду (75 мл) через лійку для сипучих речовин. Починають швидко перемішувати.

15. Вносять у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл 1,0 екв. дитіоніту натрію (22,95 г) через лійку для сипучих речовин, після чого відразу додають у реакційну колбу.

16. Швидко перемішують тверді частки доти, поки не розчиниться їх більша частина.

17. Швидко переносять суміш, що містить дитіоніт натрію, із колби Ерленмейєра об'ємом 250 мл у реакційну суміш через лійку для сипучих речовин.

18. Перемішують реакційну суміш при 50°C протягом 30 хвил.

19. Вносять у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл воду (150 мл) через лійку для сипучих речовин.

20. Вносять у колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл 2,0 екв. дитіоніту натрію (45,90 г) через лійку для сипучих речовин, після чого відразу додають у реакційну колбу.

21. Швидко перемішують тверді частки доти, поки не розчиниться їх більша частина.

22. Швидко переносять суміш, що містить дитіоніт натрію, із колби Ерленмейєра об'ємом 250 мл у реакційну суміш через лійку для сипучих речовин.

23. Перемішують реакційну суміш при 50°C протягом 60 хвил.

24. Беруть зразок для перевірки того, чи закінчилася реакція.

25. Якщо реакція закінчилася на $\geq 98\%$, то переходять до стадії 36. Якщо ні, то продовжують проведення реакції зі стадії 26.

26. Вносять у реакційну колбу об'ємом 2 л 1,0 екв. дитіоніту натрію (22,95 г) через лійку для сипучих речовин.

27. Швидко перемішують реакційну суміш при 50°C протягом 60 хвил.

28. Беруть зразок для перевірки того, чи закінчилася реакція.

29. Якщо реакція закінчилася на $\geq 98\%$, то переходять до стадії 36. Якщо ні, то продовжують проведення реакції зі стадії 30.

30. Вносять у реакційну колбу об'ємом 2 л 1,0 екв. карбонату натрію (13,97 г) через лійку для сипучих речовин.

31. Швидко перемішують реакційну суміш при 50°C протягом 15 хвил.

32. Вносять у реакційну колбу об'ємом 2 л 1,0 екв. дитіоніту натрію (22,95 г) через лійку для сипучих речовин.

33. Швидко перемішують реакційну суміш при 50°C протягом 60 хвил.

34. Беруть зразок для перевірки того, чи закінчилася реакція.

35. Якщо реакція закінчилася на $\geq 98\%$, то переходять до стадії 36.

36. Після того, як встановлено, що реакція закінчилася, вносять у реакційну колбу об'ємом 2 л воду (125 мл) через лійку для сипучих речовин.

37. Охолоджують реакційну суміш до 10°C і перемішують протягом 1 год.

38. Виділяють продукт шляхом фільтрації через грубий фільтр зі спеченого скла.

39. Промивають реактор водою (50 мл). Переносять змив на фільтр.

40. Сушать вологий осад на фільтрі доти, поки він не перестане капати.

41. Вносять у реакційну колбу об'ємом 2 л воду (500 мл) через лійку для сипучих речовин.

42. Переносять осад на фільтрі в реакційну колбу через лійку для сипучих речовин.

43. Перемішують продукт при кімнатній температурі протягом 60 хвил.

44. Виділяють продукт шляхом фільтрації через грубий фільтр зі спеченого скла.

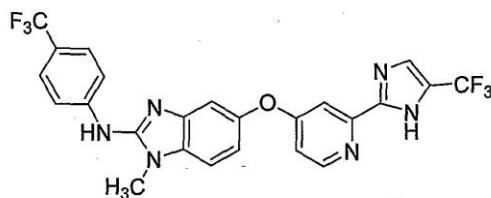
45. Промивають реактор водою (25 мл). Переносять змив на фільтр.

46. Сушать вологий осад на фільтрі протягом приблизно 1 год.

47. Переносять продукт у круглодонну колбу (одногорлу) об'ємом 2 л і сушать при повільному перекиданні за допомогою роторного випарника при температурі бані 50°C до досягнення постійної маси.

Приклад 73

Одержання {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)аміну



{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін можна одержувати відповідно до наступної процедури:

1. Забезпечують круглодонну колбу (4-х горлу) об'ємом 2 л механічною мішалкою, датчиком для вимірювання внутрішньої температури, терморегулятором, пристроєм для продувки азотом і конденсатором.

2. Вносять у реактор 4-(2-(5-(трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N1-метилбензол-1,2-діамін (200 г) через лійку для сипучих речовин.

3. Вносять у реактор ацетонітрил (1 л) через лійку для сипучих речовин.

4. Починають перемішувати суміш при температурі навколишнього середовища в атмосфері азоту.

5. Через 20 ± 5 хвил. вносять у реактор 4-трифторметилфенілізотіоціанат (104 г) через лійку для сипучих речовин.

6. Через 30 хвил. після додавання ізотіоціанату беруть зразок для перевірки того, чи закінчена реакція.

7. Якщо реакція закінчена, то фільтрують суміш через грубий фільтр зі спеченого скла.

8. Промивають реактор MeCN (200 мл). Переносять змив на фільтр.

9. Промивають вилучені тверді частки MeCN (200 мл).

10. Переносять фільтрат в 4-х горлу круглодонну колбу об'ємом 3 л, оснащену механічною мішалкою, датчиком для вимірювання внутрішньої температури, терморегулятором, пристроєм для продувки азотом та конденсатором.

11. Вносять у реактор N,N-діізопропілетиламін через лійку для сипучих речовин.

12. Вносять у реактор хлорид 2-хлор-1,3-диметилімідазолінію через лійку для сипучих речовин у вигляді чотирьох однакових порцій кожні 10 хвил. (загальний час додавання становить 30 хвил.). Після останнього додавання реакційну суміш перемішують ще протягом 10 хвил.

13. Нагрівають реакційну суміш до $50 \pm 5^\circ\text{C}$.

14. Через 30 хвил. після нагрівання беруть зразок для перевірки того, чи закінчена реакція.

15. Якщо реакція закінчена, то переносять реакційну суміш через вбудований патронний 0,2-міліметровий фільтр у круглодонну колбу об'ємом 3 л, оснащену як для стадії 10.

16. Додають воду через лійку для сипучих

речовин.

17. Нагрівають реакційну суміш до $50 \pm 5^\circ\text{C}$.

18. Після нагрівання протягом 2 год. суміші дають остигнутися до $20\text{--}25^\circ\text{C}$ та перемішують ще протягом 1 год.

19. Виділяють продукт шляхом фільтрації через середній фільтр зі спеченого скла.

20. Промивають реактор сумішшю 2:1 MeCN/вода (300 мл). Переносять змив на фільтр.

21. Промивають осад на фільтрі сумішшю 2:1 MeCN/вода (300 мл).

22. Сушать вологий осад на фільтрі протягом приблизно 1 год.

23. Переносять продукт на сушильну чашку та сушать продукт у вакуумній печі при $70 \pm 5^\circ\text{C}$ при слабкому струмені азоту доти, поки кількість залишкового MeCN (ацетонітрил) настане менше 410 част./млн.

24. Для здійснення перекристалізації продукт нагрівають до температури дефлегмації в 15 об'ємах (мас./об.) EtOH у реакторі, забезпеченому механічною мішалкою, датчиком для вимірювання внутрішньої температури, терморегулятором, пристроєм для продувки азотом та конденсатором.

25. Суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хвил., після чого дистиляційну насадку замінюють на конденсатор.

26. EtOH відганяють доти, поки не залишиться 4 об'єми. Нагрівання припиняють і додають один об'єм води.

27. Суміші дають остигнутися до $0\text{--}5^\circ\text{C}$.

28. Виділяють продукт шляхом фільтрування через середній фільтр зі спеченого скла.

29. Промивають реактор сумішшю 4:1 EtOH/вода (1 об'єм). Переносять змив на фільтр.

30. Промивають осад на фільтрі водою (1 об'єм).

31. Сушать вологий осад на фільтрі протягом приблизно 1 год.

32. Переносять продукт на сушильну чашку та сушать продукт у вакуумній печі при $50 \pm 5^\circ\text{C}$ при слабкому струмені азоту до досягнення постійної маси.

Приклад 74

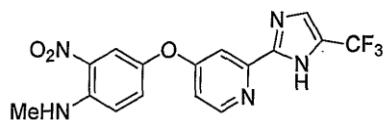
Одержання {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)аміну

4-трифторметилфенілізотіоціанат (200 мг, 1 ммоль) додавали до суміші, що містить 4-(2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N1-метилбензол-1,2-діамін (350 мг, 1 ммоль) в 3 мл ацетонітрилу. Після перемішування протягом 20 хвил. при температурі навколишнього середовища результати ВЕРХ показали, що відбулося повне перетворення. Додавали триетиламін (0,3 мл, 2,2 ммоль), а потім йодид 2-хлор-1-метилпіридинію (270 мг, 1,05 ммоль).

Реакційну суміш нагрівали до 50°C протягом 5 год. Нагрівання припиняли та додавали 1,5 мл води. Після перемішування суміші протягом 2 год. твердий продукт збирали фільтрацією та промивали сумішшю 2:1 ацетонітрил/вода (3×1 мл), одержуючи 317 мг (61%) зазначеної в заголовку сполуки.

Приклад 74a

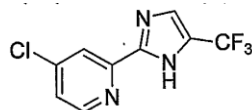
Одержання 4-(2-(5-(трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N-метил-2-нітробензоламіну



NaOMe (1,5 мл, 6,3 ммоль, 25 мас. % в MeOH) додавали до суміші, що містить 4-(4-(метиламіно)-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонітрил (1,72 г, 6,3 ммоль) в 1-PrOH (10 мл). Суміш нагрівали до 50°C (внутрішня температура). Після нагрівання протягом 1 год. результати ВЕРХ показали, що відбулося повне перетворення вихідного продукту. Додавали NH_4OAc (1,46 г, 18,9 ммоль) і суміш нагрівали до 70°C . Після витримувannya протягом 1 год. при 70°C , суміш нагрівали до 85°C . Одночасно додавали 3-бром-1,1,1-трифторацетон (0,8 мл, 7,56 ммоль) у вигляді чотирьох порцій по 0,2 мл через кожні 30 хвил. Суміш витримували при 85°C протягом 20 год. Потім суміші давали остигнутися до температури навколишнього середовища та додавали воду (10 мл). Після перемішування протягом декількох годин суміш охолоджували у бані лід/вода. Після витримувannya протягом 1 год. у бані лід/вода твердий продукт збирали фільтрацією та промивали сумішшю 1:1 1-PrOH/вода (2×7 мл). Твердий продукт сушили у вакуумній печі при 50°C протягом приблизно 16 год., одержуючи 0,982 г (41%) зазначеної в заголовку сполуки.

Приклад 74b

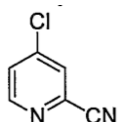
Одержання 4-хлор-2-(5-(трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридину



NaOMe (0,46 мл, 2 ммоль, 25 мас. % в MeOH) додавали до суміші, що містить 4-хлор-2-ціанопіридин (277 мг, 2 ммоль) у 1-PrOH (3 мл). Суміш нагрівали до 50°C (температура в реакційному блоці). Після нагрівання протягом 1 год. результати ВЕРХ-аналізу показали, що відбулося повне перетворення вихідного матеріалу. Суміш нагрівали до 70°C і додавали NH_4OAc (462 мг, 6 ммоль). Після витримувannya протягом 1 год. при 70°C суміш нагрівали до 85°C . Одночасно додавали 3-бром-1,1,1-трифторацетон (0,25 мл, 2,4 ммоль) у вигляді 4-х порцій по 0,063 мл через кожні 30 хвил. Суміш витримували при 85°C протягом приблизно 20 год. Неочищений продукт за даними ВЕРХ-аналізу мав чистоту 72,4% (LCAP), що підтверджували за допомогою РХ-МС-аналізу.

Приклад 74в

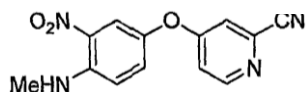
4-хлор-2-ціанопіридин



4-Хлор-2-піридинкарбоксамід (93,9 г, 0,6 моль) і TEA (125 мл, 0,9 моль) в EtOAc (500 мл) охолоджували до 0,2°C за допомогою зовнішнього охолоджуючого пристрою. За допомогою краплинної лійки додавали ТФОА (92 мл, 0,66 моль) протягом 40 хвил. У процесі додавання внутрішня температура підвищувалася до 10°C. Після завершення додавання температура становила 0,0°C. Після додавання охолоджуючий пристрій відключали. Ще через 30 хвил. за даними ВЕРХ-аналізу було присутнє 4,3% (LCAP) вихідного продукту. Додавали ще 8,3 мл (0,06 моль) ТФОА. Після перемішування ще протягом 20 хвил. результати ВЕРХ-аналізу показали, що відбулося повне перетворення. Додавали 10%-ний водний розчин K_2CO_3 (мас./об., 500 мл). Внутрішня температура підвищувалася від 13,7 до 22,0°C. Після перемішування протягом 20 хвил. суміш переносили в ділильну лійку. Шари відокремлювали та водний шар екстрагували за допомогою EtOAc (150 мл). Об'єднані органічні шари промивали 10%-ною водною лимонною кислотою (мас./об., 300 мл), сушили (Na_2SO_4), фільтрували та концентрували. Неочищений продукт сушили у вакуумній печі при 50°C протягом 16 год., одержуючи 72,85 г (87%) зазначеної в заголовку сполуки: 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,6 (m, 1 H), 7,7 (m, 1H), 7,5 (m, 1H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 151,8, 145,3, 134,9, 128,7, 127,4, 116,1; вихід по даним ВЕРХ >99% (LCAP).

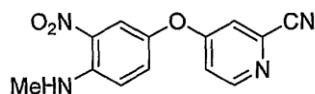
Приклад 74г

4-(4-метиламіно-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонітрил



Суміш, що містить 4-хлор-2-ціанопіридин (6,9 г, 0,05 моль), 4-метиламін-3-нітрофенол (8,4 г, 0,05 моль) і K_2CO_3 (10,4 г, 0,075 моль) у ДМСО (80 мл), нагрівали до 60°C. Через 11,5 год. за даними ВЕРХ-аналізу відбувалося повне перетворення обох вихідних продуктів. Після охолодження до 20°C до реакційної суміші додавали воду (240 мл). Температура піднімалася до 40°C, після чого знижувалася до температури навколишнього середовища. Твердий продукт збирали фільтрацією та промивали водою (2×40 мл). Потім твердий продукт суспендували в гептані (40 мл). Неочищений продукт сушили у вакуумній печі при 50°C протягом 16 год., одержуючи 10,33 г (76%) зазначеної в заголовку сполуки: 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 8,5 (m, 1H), 8,2 (m, 1H), 7,9 (m, 1H), 7,7 (m, 1H), 7,5 (m, 1H), 7,2 (m, 1H), 7,1 (m, 1H), 3,0 (s, 3H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $DMCO-d_6$) δ 165,1, 152,9, 144,4, 140,6, 134,1, 130,4, 130,1, 117,9, 117,1, 117,0, 116,5, 114,9, 29,8; APCI MS $[M+H]^+=271$; вихід по даним ВЕРХ >99% (LCAP).

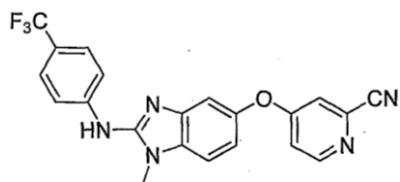
Приклад 74д
4-(4-Метиламіно-3-амінофенокси)піридин-2-карбонітрил



4-(4-Метиламіно-3-нітрофенокси)піридин-2-карбонітрил (5,0 г, 0,019 моль) в EtOH (15 мл) нагрівали до 40°C. Додавали Na_2CO_3 (4,7 г, 0,044 моль), а потім H_2O (8,4 мл). Додавали $Na_2S_2O_4$ (3,3 г, 0,019 моль), а потім H_2O (10 мл). Температура зростала від 41,7 до 49,5°C. Після охолодження до 41,7°C додавали $Na_2S_2O_4$ (3,3 г, 0,019 моль), а потім H_2O (10 мл). Температура зростала до 44,5°C. Після охолодження до 36,7°C додавали $Na_2S_2O_4$ (6,6 г, 0,038 моль), а потім H_2O (20 мл). Температура зростала до 44,0°C. За даними ВЕРХ-аналізу було присутнє 4,1% (LCAP) вихідного продукту. Додавали додаткову порцію $Na_2S_2O_4$ (3,3 г, 0,019 моль). Після перемішування ще протягом 15 хвил. нагрівання припиняли та додавали H_2O (12,5 мл). При температурі 25°C додавали додаткову порцію Na_2CO_3 (1,3 г, 0,012 моль) і суміш охолоджували в бані з льодом/водою. При температурі менше 5°C суміші давали зостаритися протягом 30 хвил. (кінцева температура 1,5°C). Твердий продукт збирали фільтрацією та промивали H_2O (10 мл, а потім 5 мл). Твердий продукт сушили на фільтрі протягом 30 хвил. і потім переносили в реакційну колбу та додавали H_2O (50 мл). Суміш перемішували протягом 45 хвил. Потім твердий продукт збирали фільтрацією та промивали H_2O (2×10 мл). Неочищений продукт сушили у вакуумній печі при 50°C протягом 16 год., одержуючи 3,50 г (76%) зазначеної в заголовку сполуки: 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 8,5 (m, 1H), 7,5 (m, 1H), 7,1 (m, 1H), 6,3 (m, 2H), 4,8 (s, 2H), 4,7 (s, 1H), 2,7 (s, 3H); APCI MS $[M+H]^+=241$; вихід за даними ВЕРХ >99% (LCAP).

Приклад 74е

4-[1-метил-2-(4-(трифторметил)феніламіно)-1H-бензімідазол-5-ілокси]піридин-2-карбонітрил.

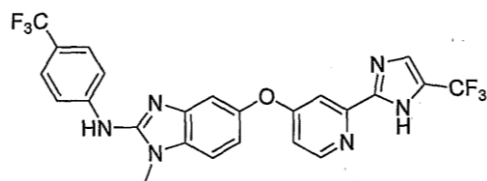


4-(Трифторметил)фенілізотіоціанат (9,65 г, 0,0475 моль) додавали до розчину 4-(4-метиламіно-3-амінофенокси)піридин-2-карбонітрилу (12,0 г, 0,05 моль) в MeCN (60 мл). Через 40 хвил. результати ВЕРХ-аналізу показали, що відбулося повне перетворення аміну. Суміш фільтрували та вилучені тверді частки промивали MeCN (2×12 мл). До фільтрату додавали ДІПЕА (17,5 мл, 0,1 моль). Додавали хлорид 2-хлор-1,3-диметилімідазолінію (ДМХ) у вигляді 4-х порцій по 2,11 г (8,44 г, 0,05 моль) через кожні 10

хвил. Після останнього додавання суміші давали перемішуватися ще протягом 10 хвил., після чого ВЕРХ-аналіз показав, що відбулося повне перетворення. Потім суміш нагрівали до 50°C (внутрішня температура). Після витримання протягом 45 хвил. при 50°C ВЕРХ-аналіз показав, що відбулося повне перетворення. Суміші давали охутитися до температури навколишнього середовища та потім додавали H₂O (45 мл). Спочатку реакційна суміш була гомогенною, потім сполука починала осаджуватися із суміші. Після перемішування протягом 2 год. твердий продукт збирали фільтрацією та промивали сумішшю 2:1 MeCN/H₂O (2×20 мл). Неочищений продукт сушили у вакуумній печі при 50°C протягом 16 год., одержуючи 16,10 г (78%) зазначеної в заголовку сполуки ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,5 (m, 1H), 8,5 (m, 1H), 8,0 (m, 2H), 7,7 (m, 2H), 7,6 (m, 1H), 7,4 (m, 1H), 7,3 (m, 1H), 7,1 (m, 1H), 6,9 (m, 1H), 3,7 (m, 3H); АРСІ МС [M+H]⁺=410; вихід за даними ВЕРХ >99% (LCAP).

Приклад 74ж

{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін

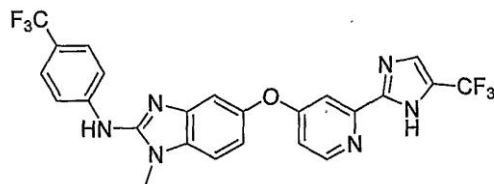


NaOMe (0,23 мл, 1 ммоль, 25 мас. % в MeOH) додавали до суміші, отриманої в прикладі 74е (409 мг, 1 ммоль) в MeOH (4 мл). Після витримання протягом 1 год. при температурі навколишнього середовища ВЕРХ-аналіз показав присутність 46,2% (LCAP) вихідного продукту. Суміш нагрівали до 50°C (температура в реакційному блоці). Після витримання протягом 1 год. за даними ВЕРХ-аналізу було присутнє 4,1% (LCAP) вихідного продукту. Додавали NH₄OAc (231 мг, 3 ммоль), а потім 3-бром-1,1,1-трифторацетон (0,13 мл, 1,2 ммоль). Суміш витримували при 50°C протягом приблизно 20 год. Додавали додаткову порцію 3-бром-1,1,1-трифторацетону (0,06 мл, 0,58 ммоль) та суміш нагрівали до 60°C. Після витримання протягом 24 год. при 60°C суміші давали охутитися до температури навколишнього середовища. Додавали воду (4 мл), а потім EtOAc (4 мл). Шари відокремлювали та водний шар екстрагували EtOAc. Об'єднані органічні шари сушили (Na₂SO₄), фільтрували та концентрували. Неочищений продукт розчиняли у ІПС (4 мл). До 1 мл розчину продукту в ІПС додавали метансульфонову кислоту (0,020 мл). Суміш витримували протягом ночі при 80°C. Потім суміш охолоджували до температури навколишнього середовища та концентрували, одержуючи зазначену в заголовку сполуку: АРСІ МС [M+H]⁺=519.

Приклад 74з

{1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-

трифторметилфеніл)-амін



NaOMe (0,23 мл, 1 ммоль, 25 мас. % в MeOH) додавали до суміші продукту, отриманого в прикладі 74е (409 мг, 1 ммоль), з 1-PrOH (2 мл). Суміш нагрівали до 50°C (температура в реакційному блоці). Після витримання протягом 1 год. за даними ВЕРХ-аналізу відбувалося повне перетворення вихідного продукту. Суміш нагрівали до 70°C та додавали NH₄OAc (231 мг, 3 ммоль). Після витримання протягом 1 год. при 70°C суміш нагрівали до 85°C. Одночасно додавали 3-бром-1,1,1-трифторацетон (0,13 мл, 1,2 ммоль) у вигляді 4-х порцій по 0,033 мл через кожні 30 хвил. Суміш витримували при 85°C протягом приблизно 20 год. Суміші давали охутитися до температури навколишнього середовища та додавали воду (2 мл). Після перемішування протягом декількох годин твердий продукт збирали фільтрацією та промивали сумішшю 1:1 1-PrOH/вода (2×3 мл). Твердий продукт сушили у вакуумній печі при 50°C протягом приблизно 16 год., одержуючи 0,11 г (21%) зазначеної в заголовку сполуки.

Приклад 75

Одержання {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)аміну

4-Трифторметилфенілізотіоціанат (200 мг, 1 ммоль) додавали до суміші, що містить 4-(2-(5-(трифторметил)-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси)-N1-метилбензол-1,2-діамін (350 мг, 1 ммоль) і 3 мл ацетонітрилу. Після перемішування протягом 20 хвил. при температурі навколишнього середовища ВЕРХ-аналіз показав, що відбулося повне перетворення. Суміш, що містить тіосечовину (553 мг, 1 ммоль) в POCl₃ (3 мл), перемішували при температурі навколишнього середовища. Через 4 год. суміш нагрівали приблизно до 50°C. Після витримання впродовж 2 год. ВЕРХ-аналіз показав, що реакція закінчилася.

Приклад 76

Аналіз Raf/Mek методом фільтрації

Буфери:

буфер для аналізу: 50 mM Tris, р 7,5, 15mM MgCl₂, 0,1mM ЕДТК, 1mM ДТТ;

буфер для відмивання: 25mM Hepes, рН 7,4, 50mM пірофосфат натрію, 500mM NaCl;

реагент для припинення реакції: 30mM ЕДТК.

Матеріали

Raf, активна: фірма Upstate Biotech, №14-352;

Mek, неактивна: фірма Upstate Biotech, №14-205;

³³P-АТФ: NEN фірма Perkin Elmer №NEG 602 h;

96-лункові планшети для аналізу: поліпропі-

ленові планшети з U-образним дном фірми Falcon №35-1190;

фільтруючий пристрій: фірма Millipore, №MAVM 096 OR;

96-лункові планшети для фільтрації: фірма Millipore Immobilon 1 №MAIP NOB;

сцинтиляційна рідина: фірма Wallac OptiPhase "SuperMix" №1200-439.

Умови аналізу

концентрація Raf приблизно 120 нМ;

концентрація Mek приблизно 60 нМ;

концентрація ^{33}P -АТФ 100 нМ;

тривалість реакції 45-60 хвил. при кімнатній температурі.

Протокол аналізу

Raf та Mek об'єднували в 2X кінцевих концентраціях у буфері для аналізу (50 мМ Tris, pH 7,5, 15 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ ЕДТК та 1 мМ ДТТ) і розподіляли з розрахунку 15 мкл на лунку в поліпропіленові планшети для аналізу (96-лункові планшети для аналізу: поліпропіленові планшети з U-образним дном фірми Falcon №35-1190). Вихідні рівні визначали в лунках, що містять Mek та ДМСО без Raf.

У лунки, що містять Raf/Mek, додавали по 3 мкл 10X тестованої сполуки, що являє собою інгібітор кінази Raf, що розведено в 100% ДМСО. Для ініціації реакції за участю активності кінази Raf додавали 12 мкл на лунку $2,5 \times ^{33}\text{P}$ -АТФ, розведеного в буфері для аналізу. Через 45-60 хвил. реакцію припиняли шляхом додавання 70 мкл реагенту для припинення реакції (30 мМ ЕДТК). Планшети для фільтрації попередньо змочували протягом 5 хвил. 70%-ним етанолом і потім промивали шляхом фільтрації буфером для відмивання. Після цього зразки (90 мкл) з лунок, у яких проводили реакцію, переносили на планшети для фільтрації. Планшети для фільтрації 6X промивали буфером для відмивання з використанням пристрою для фільтрації фірми Millipore. Планшети сушили та додавали по 100 мкл на лунку сцинтиляційної рідини (Wallac OptiPhase «SuperMix» №1200-439). Потім визначали кількість імпульсів у хвилину (CPM) за допомогою рідера типу Wallac Microbeta 1450.

Приклад 77

Аналіз 2: Скринінг біотинільованої Raf

Скринінг Raf in vitro

Активність різних ізоформ серінових/треонінових кіназ Raf можна вимірювати, використовуючи АТФ як субстрат для MEK та оцінюючи перенос фосфатного фрагменту на MEK-залишок. Рекombінантні ізоформи Raf одержували шляхом очищення із клітин комах лінії sf9, інфікованих рекombінантним бакуловірусним експресійним вектором, що несе людську Raf. Неактивну рекombінантну кіназу MEK експресували в E. coli і після очищення мітили біотином. Для кожного аналізу тестуємі сполуки серійно розводили в ДМСО, потім змішували з Raf (0,50 нМ) і неактивною міченою біотином кіназою MEK (50 нМ) у буфері для реакції, що містить АТФ (1 мкМ). Потім реакційні суміші інкубували протягом 2 год. при кімнатній температурі та реакцію припиняли шляхом додавання 0,5 М ЕДТК. Реакційну

суміш після припинення реакції переносили на сенсibilізований нейтравідином планшет (фірма Pierce) і інкубували протягом 1 год. Фосфорильований продукт оцінювали за допомогою флуоресцентної системи з часовим розділенням типу DELFIA (фірма Wallac) з використанням кролячого антитіла до фосфорильованої MEK (p-MEK) (фірма Cell Signaling) як первинне антитіло та міченого за допомогою європію антикролячого антитіла як вторинне антитіло. Флуоресценцію з часовим розділенням вимірювали за допомогою флуорометра типу Wallac 1232 DELFIA. Концентрацію кожної сполуки, що викликає 50%-не інгібування (IC_{50}) розраховували за способом нелінійної регресії за допомогою програми для аналізу даних XL Fit.

З використанням процедур, описаних у прикладах 76 або 77, було встановлено, що сполуки із прикладів 1-64 мають інгібуючу активність у відношенні кінази Raf, що характеризується величиною IC_{50} менше 5 мкМ.

Приклад 78

Інгібування росту пухлини меланоми

3×10^6 клітин людської меланоми лінії A375M імплантували підшкірно в правий бік 10-12-тижневим самкам мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлини досяг приблизно 150 mm^3 (через 17 днів після імплантації), мишей розподіляли довільно залежно від об'єму пухлини на чотири групи по дев'ять мишей у кожній та починали обробку сполукою, запропонованою у винаході. Мишам вводили щодня протягом 14 днів пероральним шляхом через зонд або тільки наповнювач, або 10 мг/кг, 30 мг/кг або 100 мг/кг сполуки із прикладу 25, у кожному випадку в об'ємі 0,2 мл. Об'єм пухлини вимірювали двічі на тиждень за допомогою цифрових циркулів. Середній об'єм пухлини представлений на Фіг. 1.

Приклад 79

Інгібування передачі сигналу кінази Raf у клітинах меланоми

Так само, як та у прикладі 78, 3×10^6 клітин людської меланоми лінії A375M імплантували підшкірно в правий бік 10-12-тижневим самкам мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлини досяг приблизно 150 mm^3 (через 17 днів після імплантації), мишей розподіляли довільно залежно від об'єму пухлини на чотири групи та вводили щодня протягом 5 днів пероральним шляхом через зонд або тільки наповнювач, або 10 мг/кг, 30 мг/кг або 100 мг/кг сполуки із прикладу 25, у кожному випадку в об'ємі 0,2 мл. Через 4 та 24 год. після введення дози мишей вмертвляли, виділяли пухлини та швидко заморожували.

Заморожені пухлини піддавали відтаванню на льоді, зважували та потім гомогенізували в буфері RIPA, що містить мінітаблетки суміші (коктейлю) інгібіторів протеази без ЕДТК фірми Roche Complete (2 таблетки на 25 мл буферу), 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (PMSF) і 1-разовий коктейль II інгібіторів фосфатази фірми Sigma, за допомогою гомогенізатора фірми Roche Magna (2 цикли по 1 хвил. при 6500

об./хвил. при 4°C). На кожні 100 мг пухлинної тканини додавали 1 мл буфера для лізису RIPA. Гомогенати центрифугували при 14000 об./хвил. протягом 20 хвил. у мікроцентрифузі при 4°C, а потім піддавали додатковій гомогенізації за допомогою пристрою типу Qiagen QiaShredders (9000 об./хвил. протягом 2 хвил. при 4°C). Концентрацію білка визначали за допомогою BCA-аналізу білка, розробленого фірмою Pierce, і потім вносили по 20 мкг кожного зразку на лунку в 4-20%-ний Тріс-гліциновий поліакриламідний гель із ДСН. Після ПААГ білок переносили на нітроцелюлозні мембрани, блокували (5%-не знежирене порошкоподібне молоко в TBST) протягом 1 год. при кімнатній температурі та потім зондували протягом ночі при 4°C з використанням розведення 1:1000 (у блокуючому буфері) кролячого поліклонального антитіла до фосфо-ERK1/2 (фірма Cell Signalling, №9101), кролячого поліклонального антитіла до фосфо-MEK (фірма Cell Signalling, №9121), кролячого поліклонального антитіла до ERK1/2 (фірма Cell Signalling, №9102) або кролячого поліклонального антитіла до MEK (фірма Cell Signalling, №9122). Після цього мембрани промивали TBST 5 разів (по 5 хвилин щоразу) при кімнатній температурі та в усі блоти додавали мічене за допомогою HRP козяче антикроляче антитіло в розведенні 1:5000 (у блокуючому буфері) та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 год. Потім мембрани промивали TBST 5 разів (по 5 хвилин щоразу) та мембрани інкубували з Pierce Super-Signal протягом 4 хвил., після чого експонували на плівку з часом експозиції від 1 сек. до 20 хвил. Результати, отримані для зразків, взятих через 4 та 24 год. після введення дози, представлені на Фіг. 2А та Фіг. 2Б відповідно.

Приклад 80

Інгібування росту злоякісної пухлини товстої кишки

2×10^6 клітин раку товстої кишки людини лінії HT29P імплантували підшкірно в правий бік 10-12-тижневим самкам мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлини досяг приблизно 250 мм^3 (через 14 днів після імплантації), мишей розподіляли довільно залежно від об'єму пухлини на чотири групи по десятьох особин у кожній та починали обробку сполукою, запропонованою у винаході. Мишам вводили щодня протягом 14 днів пероральним шляхом через зонд або тільки наповнювач, або 10 мг/кг, 30 мг/кг або 100 мг/кг сполуки із прикладу 25, у кожному випадку в об'ємі 0,2 мл. Об'єм пухлини вимірювали двічі на тиждень за допомогою цифрових циркулів. Середній об'єм пухлини представлений на Фіг. 3.

Приклад 81

Інгібування передачі сигналу кінази Raf у клітинах раку товстої кишки

3×10^6 клітин раку товстої кишки людини лінії HT29P імплантували підшкірно в правий бік 10-12-тижневим самкам мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлини досяг приблизно 150 мм^3 (через 17 днів після імплантації), мишей розподіляли довільно залежно

від об'єму пухлини на чотири групи та починали обробку сполукою, запропонованою у винаході. Мишам вводили щодня протягом 5 днів пероральним шляхом через зонд або тільки наповнювач, або 10 мг/кг, 30 мг/кг або 100 мг/кг сполуки із прикладу 25, у кожному випадку в об'ємі 0,2 мл. Через 1, 4 та 24 год. після введення доз мишей вмертвляли, вирізали пухлини та швидко заморожували. Заморожені пухлини обробляли відповідно до процедури, описаної в прикладі 79. Результати, отримані для зразків, взятих через 1, 4 та 24 год. після введення доз, представлені на Фіг. 4А, 4Б і 2В відповідно.

Приклад 82

Інгібування передачі сигналу кінази Raf сполукою із прикладу 1 у біохімічному аналізі in vitro

Аналіз Raf in vitro

Інгібуючу дію сполуки із прикладу 1: {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)аміну, у відношенні В-Raf дикого типу, с-Raf дикого типу та мутантної В-Raf (V600E) оцінювали за допомогою наступного аналізу з використанням біотинільованої мітки. Кіназну активність різних ізоформ серінових/треонінових кіназ Raf вимірювали, використовуючи АТФ, рекомбінантну неактивну кіназу субстрат MEK, і оцінюючи перенос фосфатного фрагмента на MEK-залишок. Рекомбінантну повнорозмірну MEK, що має інактивуючу мутацію сайту зв'язування АТФ K97R (що приводить до втрати кіназної активності) експресували в *E. coli* та після очищення мітили біотином. кДНК MEK субклонували з N-кінцевою міткою (his)₆ та експресували в *E. coli*, та рекомбінантний субстрат MEK очищували з лізату *E. coli* за допомогою нікель-афінної хроматографії та наступної аніонообмінної хроматографії. Кінцевий препарат субстрату MEK біотинілювали (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin фірми Pierce) і концентрували до концентрації 11,25 мкМ. Рекомбінантні В-Raf, с-Raf та мутантну В-Raf одержували шляхом очищення із клітин комах лінії sf9, інфікованих відповідними експресійними векторами, що несуть людську рекомбінантну Raf. Рекомбінантні ізоформи Raf очищали шляхом взаємодії з антитілом до Glu або за допомогою хроматографії з використанням іонів металу.

Для кожного аналізу сполуку із прикладу 1 серійно розводили в ДМСО та потім змішували з В-Raf, с-Raf або мутантною В-Raf (концентрація кожної 0,50 нМ). Субстрат, що являє собою неактивну біотинільовану кіназу MEK (50 нМ) додавали в буфер для реакції, що містить АТФ (1 мкМ). Буфер для реакції містив 30 мМ Тріс-НСІ, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 4 мМ ЕДТК, 25 мМ бета-гліцерофосфат, 5 мМ MnCl₂ та 0,01% БСА/ЗФР. Потім реакційні суміші інкубували протягом 2 год. при кімнатній температурі та реакцію припиняли шляхом додавання 0,5М ЕДТК. Після припинення реакції реакційну суміш перенесли на сенсоризований нейтравідином планшет (фірма Pierce) і інкубували протягом 1 год. Фосфорильований продукт оцінювали за допомогою флуоресцентної системи з часовим розділенням типу DELFIA

(фірма Wallac) з використанням кролячого антитіла до p-MEK (фірма Cell Signaling) як первинне антитіло та міченого за допомогою європію антикролячого антитіла як вторинне антитіло. Флуоресценцію з часовим розділенням вимірювали за допомогою флуориметра типу Wallac 1232 DELFIA. Концентрацію кожної сполуки, що викликає 50%-не інгібування (IC_{50}) розраховували за способом нелінійної регресії за допомогою програми для аналізу даних XL Fit.

Результати:

Сполука із прикладу 1 мала сильну інгібуючу дію ($IC_{50} < 0,1$ мкМ) відносно активності B-Raf, c-Raf та мутантної B-Raf (V600E), як проілюстровано в таблиці 3.

Таблиця 3

Інгібуюча дія in vitro сполуки
із прикладу 1 відносно активності Raf

Мішень	Сполука із прикладу 1, значення IC_{50} , отримане в біохімічному аналізі
B-Raf (V600E)	0,0053 мкМ
B-Raf	0,068 мкМ
c-Raf	0,004 мкМ

Як видно з таблиці 3, сполука із прикладу 1

має сильну інгібуючу активність у відношенні ізоформи B-Raf дикого типу, ізоформи c-Raf дикого типу та мутантної форми B-Raf (V600E) кінази Raf. Як проілюстровано на Фіг. 5, вважається, що кінази Raf є основними ефекторами Ras у шляху передачі сигналу MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK). Кінази Raf активуються Ras та фосфорилують та активують Mek1 та Mek2, які, у свою чергу, активують мітоген-активовані кінази 1 та 2 (MAPK) у шляху MAPK. Відомо, що кінази Raf впливають та регулюють клітинну проліферацію, диференціювання, виживання, онкогенну трансформацію та апоптоз. Встановлено, що ізоформа B-Raf є найбільш активною формою Raf, що бере участь у передачі сигналу та має вирішальне значення для поширення сигналу Ras.

Як продемонстровано нижче в таблиці 4, шлях передачі сигналу MAPK відіграє роль у багатьох типах раку людини. Мутації Ras (активуючі) виявлені в 15% всіх випадків раку людини. Мутації ERK (гіперактивуючі) виявлені в 30% всіх випадків раку людини. Онкогенні мутації, пов'язані з раком, часто присутні в деяких компонентах цього шляху, наприклад, мутантна B-Raf (V600E) зустрічається приблизно в 70% випадків меланом та приблизно 12% випадках карциноми товстої кишки (Davies та ін., вище; Yuen та ін., вище та Brose та ін., вище).

Таблиця 4

Кореляція між присутністю мутантних молекул,
що беруть участь у шляху передачі сигналу MAPK і несприятливим клінічним результатом

Показання	Мутантні молекули в шляху передачі сигналу
меланома	B-Raf (V600E) (70%); N-Ras (15%)
папілярний рак щитовидної залози	B-Raf (V600E) (35-70%); H-, K-, N-Ras (60%)
рак яєчника	B-Raf (V600E) (30%)
рак товстої кишки	B-Raf (V600E) (120%); K-Ras (45%)
рак підшлункової залози	K-Ras (90%)
недрібноклітинний рак легені	K-Ras (35%)
АЛЛ, ОМЛ	K-Ras (30%)

Див. Sebolt-Leopole та Herrera, Nature Reviews Cancer (4), 2004, с. 937.

Як продемонстровано вище в таблиці 4, мутантна форма B-Raf (V600E), що є активованою, являє собою важливу мішень при лікуванні раку, оскільки її експресія є ознакою несприятливого прогнозу, вона має конститутивну активність та функціонує в декількох типах пухлин, включаючи меланому, папілярний рак щитовидної залози, рак яєчника та рак товстої кишки. Раніше було встановлено, що інгібітори кінази Raf дикого типу, які інгібують також мутантну B-Raf, можуть служити як терапевтичні агенти у терапії раку. Наприклад, було встановлено, що виснаження мутантної B-Raf за допомогою siRNA погіршує передачу сигналу ERK і проліферацію ліній клітин меланоми (Dibb NJ. та ін., Nature Reviews Cancer (4), 2004, с. 718). Тому важливо відзначити, що сполука із прикладу 1 інгібує мутантну B-Raf навіть більшою мірою, ніж B-Raf дикого типу, що

свідчить про можливість застосування сполуки для інгібування Raf при лікуванні опосередкованих Raf захворювань, включаючи меланому, рак яєчника, папілярний рак щитовидної залози та рак товстої кишки.

Приклад 83

Інгібування передачі сигналу мутантної кінази B-Raf сполукою із прикладу 1 в аналізі, основаному на використанні клітин

1. Інгібування фосфорилування ERK

Методи:

Для оцінки інгібуючої дії сполуки із прикладу 1 в аналізі, основаному на використанні клітин, застосовували дві лінії клітин меланоми, а саме A375M (мутантна B-Raf V600E) і SKMEL-28 (мутантна B-Raf V600E). Фосфорилування ERK аналізували після обробки серійними розведеннями сполуки із прикладу 1, тобто {1-метил-5-[2-(5-

трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл)-(4-трифторметилфеніл)аміну, у клітинах лінії SKMEL-28 та клітинах лінії A375M. Значення EC₅₀ визначали на основі апроксимації даних за допомогою 4-параметричної кривої.

Результати:

Як продемонстровано в таблиці 5, сполука із прикладу 1 інгібує активність мутантної кінази B-Raf (V600E) у клітинах лінії SKMEL-28 та клітинах лінії A375M, що оцінювали по зниженню рівня pERK.

Таблиця 5

Інгібуюча дія сполуки із прикладу 1 у клітинних лініях меланоми, експресуючих мутантну B-Raf

Клітинна лінія, експресуюча мутантну B-Raf (V600E)	Значення EC ₅₀ , що характеризує інгібування pERK сполукою із прикладу 1
A375M	160 нМ
SKMEL-28	100 нМ

2. Інгібування фосфорилування MEK

Методи:

Для оцінки інгібуючої дії сполуки із прикладу 1 в аналізі з використанням клітин застосовували три лінії клітин меланоми, а саме A375M (мутантна B-Raf V600E), SKMEL-2 (Raf дикого типу, мутантна N-Ras) та CHL-1 (Raf дикого типу, Ras дикого типу). Три лінії клітин інкубували при 37°C в 0,1%-ній фетальній бичачій сироватці зі сполукою із прикладу 1 у концентраціях 0,1, 0,5, 1, 5 та 10 мкМ. Після інкубації протягом 4 год. аналізували фосфорилування MEK за допомогою аналізу методом Вестерн-блотингу.

Результати:

Результати представлені на Фіг. 6А, 6Б та 6В. Як продемонстровано на Фіг. 6А, сполука із прикладу 1 є сильним інгібітором передачі сигналу Raf у напрямку його поширення в клітинах A375M (Фіг. 6А), клітинах SKMEL-2 (Фіг. 6Б) і клітинах CHL-1 (Фіг. 6В) у діапазоні концентрації від 0,1 до 10 мкМ.

3. Інгібування незалежного від заякорювання рости клітин

Для перевірки того, що інгібування Raf при-

водить до антипроліферативної активності, сполуку із прикладу 1 тестували з використанням різних ліній клітин та ізолятів людських пухлин, вирощених на м'якому агарі, які перераховані нижче в таблиці 6.

Аналіз проліферації з використанням м'якого агару: Для кожної з ліній клітин, перерахованих нижче в таблиці 6, висівали по 500 клітин на 100 мкл в 96-лункові плоскодонні мікропланшети з ультранизьким прикріпленням фірми Corning (Corning №3474). Для доповнення середовища додавали 1% seakem GTG-агарозу (50 мкл/лунку), давали затвердіти та потім у кожен лунку додавали по 100 мкл повного середовища. Готували серійні розведення сполуки із прикладу 1, тобто {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1Н-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1Н-бензімідазол-2-іл)-(4-трифторметилфеніл)аміну до досягнення кінцевої концентрації 5% ДМСО безсироватковим середовищем, та по 25 мкл розведеної сполуки додавали в кожен лунку (кінцева концентрація ДМСО становила 0,5%). В аналіз включали також контрольну лунку, що містить 0,5% ДМСО без сполуки. Після інкубації клітин зі сполукою протягом 7 днів, у кожен лунку додавали по 25 мкл барвника Alamar Blue (фірма Trek Diagnostic Systems, №00-100) та інкубували при 37°C протягом 4 год. Планшети зчитували за допомогою рідера для флуоресцентних планшетів при довжині хвилі збудження 530 нм, довжині хвилі випромінювання 590 нм. Значення EC₅₀ визначали за допомогою апроксимації даних 4-параметричної кривої.

Сполуку із прикладу 1 тестували також з використанням панелі ізолятів людських пухлин, вирощених на м'якому агарі (фірма Oncotest, Gmb, Фрейбург, Німеччина). Зразки пухлин виділяли з організму пацієнтів і потім пересівали у вигляді шматочків пухлин мишам з порушеною імунологічною реактивністю та аналізували за допомогою описаних вище методів.

Результати:

Сполука із прикладу 1 мала сильну антипроліферативну дію відносно ліній клітин та ізолятів людських пухлин, що експресують мутантну B-Raf, мутантну K-Ras та мутантну N-Ras, що продемонстровано в таблиці 6.

Таблиця 6

Аналіз проліферації з використанням м'якого агару: інгібування сполукою із прикладу 1

Лінія клітин/ізоляти пухлини	Тип	Мутація	EC ₅₀ для сполуки із прикладу 1
WM1799 (Лінія клітин)	меланома	B-Raf (V600E)	<0,0098 мкМ
WM1799 (Лінія клітин)	меланома	B-Raf (V600E)	0,016 мкМ
A375M (Лінія клітин)	меланома	B-Raf (V600E)	0,032 мкМ
SK-MEL28 (Лінія клітин)	меланома	B-Raf (V600E)	0,07 мкМ
HT-29 (Лінія клітин)	колоректальний рак	B-Raf (V600E)	0,026 мкМ
Colo205 (Лінія клітин)	колоректальний рак	B-Raf (V600E)	0,13 мкМ
HCT-116 (Лінія клітин)	колоректальний рак	мутантна K-Ras	0,07 мкМ
LoVo (Лінія клітин)	колоректальний рак	мутантна K-Ras	0,016 мкМ

Продовження таблиці 6

Ізолят людської пухлини №1	меланома	B-Raf (V600E)	0,055 мкМ
Ізолят людської пухлини №2	меланома	B-Raf (V600E)	0,20 мкМ
Ізолят людської пухлини №3	меланома	N-Ras (Q61K)	0,57 мкМ
Ізолят людської пухлини №4	пухлина підшлункової залози	K-Ras	1,27 мкМ
Ізолят людської пухлини №5	пухлина товстої кишки	K-Ras	1,20 мкМ
Ізолят людської пухлини №6	нирково-клітинний рак	не встановлена	>1 мкМ
Ізолят людської пухлини №7	нирково-клітинний рак	не встановлена	>1 мкМ

Наявність інгібіруючої активності сполуки із прикладу 1 відносно широкої панелі ліній клітин та ізолятів людських пухлин, представлених вище в таблиці 6, свідчить про виражену антипроліферативну активність сполуки відносно пухлинних клітин, експресуючих мутантну B-Raf. Сполука має значну інгібуючу активність відносно клітин меланоми, експресуючих мутантну B-Raf у діапазоні концентрацій від <0,0098 до 0,07 мкМ. Сполука має також близький рівень інгібуючої активності відносно ліній клітин колоректального раку, що експресують мутантну B-Raf, у діапазоні концентрацій від 0,026 до 0,13 мкМ. Сполука має також виражену інгібуючу активність у відношенні двох ліній пухлинних клітин колоректального раку, що експресують мутантну K-Ras (у концентрації від 0,07 до 0,016 мкМ), це підтверджує, що інгібування B-Raf/c-Raf у контексті мутації передачі сигналу, що перебуває вище в шляху, K-Ras приводить до антипроліферативної активності.

Встановлено, що сполука із прикладу 1 при оцінці на ізолятах людських пухлин характеризується найбільш високою інгібуючою активністю відносно меланом, що експресують мутантну B-Raf ($EC_{50}=0,055$ мкМ та 0,20 мкМ), за якими йшла меланома, що експресує мутантну N-Ras ($EC_{50}=0,57$ мкМ), що погоджується з результатами, отриманими для описаних вище ліній клітин. Значення EC_{50} для пухлини підшлункової залози та однієї з колоректальних пухлин мали величину порядку 1 мкМ. Для інших пухлин значення EC_{50} було більше 1 мкМ. Вважається, що людські пухлини, виділені з організму пацієнтів, являють собою більш точну модель захворювання, ніж лінії клітин, оскільки пухлини виділяють із організму пацієнтів і пересаджують у вигляді шматочків пухлин мишам з порушеною імунологічною реактивністю. Отже, їх не відбирають шляхом вирощування на пластичних матеріалах та вони зберігають певні особливості архітектури первинної пухлини.

Слід відзначити, що сполука із прикладу 1 має інгібуючу активність у відношенні ізолятів пухлини нишково-клітинного раку в концентраціях більше 1 мкМ. Хоча генотип цих конкретних пухлин не був визначений, відомо, що пухлини нишково-клітинного раку, як правило, не експресують мутантну Ras або мутантну B-Raf. Таким чином, сполука із прикладу 1, очевидно, специфічно інгібує молекули, що беруть участь у шляху передачі сигналу MAPK, насамперед молекули кіназ Raf та Ras.

Приклад 84

Лікування за допомогою сполуки із прикладу 1 приводить до регресу пухлини на моделі ксено-

трансплантату людської меланоми A375M (що експресує B-Raf V600E)

Методи: 3×10^6 клітин людської меланоми A375M імплантували підшкірно в правий бік 10-12-тижневим самкам мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлини досяг приблизно 150 мм³ (через 17 днів після імплантації), мишей розподіляли довільно залежно від об'єму пухлини на чотири групи по дев'ятьох мишей у кожній та починали обробку сполукою із прикладу 1. Мишам вводили щодня протягом 14 днів пероральним шляхом через зонд або тільки наповнювач, або 10 мг/кг, 30 мг/кг або 100 мг/кг сполуки із прикладу 1, у кожному випадку в об'ємі 0,1 мл. Сполуку із прикладу 1, тобто {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін, одержували в 100% ПЕГ. Об'єм пухлин вимірювали двічі в тиждень за допомогою цифрових циркулів.

Аналіз методом Вестерн-блотингу

Через 8 та 24 год. після введення 14-ї дози мишей вмишували, пухлини видаляли та швидко заморожували. Заморожені пухлини піддавали відтаванню на льоді, зважували та потім гомогенізували в буфері RIPA, що містить мінітаблетки коктейлю інгібіторів протеази без ЕДТК фірми Roche Complete (2 таблетки на 25 мл буфери), 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (PMSF) і 1-разовий коктейль II інгібіторів фосфатази фірми Sigma, за допомогою гомогенізатору фірми Roche Magna (2 цикли по 1 хвил. при 6500 об./хвил. при 4°C). На кожні 100 мг пухлинної тканини додавали по 1 мл буферу для лізису RIPA. Гомогенати центрифугували при 14000 об./хвил. протягом 20 хвил. у мікроцентрифузі при 4°C, а потім піддавали додатковій гомогенізації за допомогою пристрою типу Qiagen Qiasredders (9000 об./хвил. протягом 2 хвил. при 4°C). Концентрацію білку визначали за допомогою BCA-аналізу білку, розробленого фірмою Pierce, і потім вносили по 20 мкг кожного зразку на лунку в 4-20%-ний Тріс-гліциновий поліакриламідний гель із ДСН. Після ПААГ білок переносили на нітроцелюлозні мембрани, блокували (5%-не знежирене порошкоподібне молоко в TBST) протягом 1 год. при кімнатній температурі та потім зондували протягом ночі при 4°C з використанням розведення 1:1000 (у блокуючому буфері) кролячого поліклонального антитіла до фосфо-ERK1/2 (фірма Cell Signalling, №9101), кролячого поліклонального антитіла до фосфо-MEK (фірма Cell Signalling, №9121), кролячого поліклонального антитіла до ERK1/2 (фірма Cell Signalling, №9102) або кролячого поліклонального антитіла до MEK (фірма Cell

Signalling, №9122). Аналіз модуляції маркерів, що знаходяться у напрямку поширення сигналу, здійснювали з використанням розведення 1:1000 анти-Bim антитіла (фірма Chemicon, № AB 17003), клону антитіла до цикліну DI 5D4 (фірма Upstate, №05-263), антитіла до p27Kip-1 (182-198) (фірма Calbiochem, №506127), антитіла до фосфо-AKT (S473) (фірма Cell Signaling, №9271), антитіла до фосфо-Akt (T308) (фірма Cell Signaling, №9275) і антитіла до повністю фосфорильованного Akt (фірма Cell Signaling, №9272).

Після цього мембрани промивали TBST 5 разів (по 5 хвилин щоразу) при кімнатній температурі та в усі блоти додавали мічене за допомогою HRP козяче антикозяче антитіло в розведенні 1:5000 (у блокуючому буфері) та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 год. Потім мембрани промивали TBST 5 разів (по 5 хвилин щоразу) та інкубували з Pierce Super-Signal протягом 4 хвил., після чого експонували на плівку згодом експозиції від 1 сек. до 20 хвил.

Результати:

На Фіг. 7А представлений графік, що характеризує залежність зменшення середнього об'єму пухлини від дози для пухлин людської меланоми A375M (що експресує B-Raf V600E) у мишей, яких обробляли шляхом перорального введення сполуки із прикладу 1 у дозі 10, 30 або 100 мг/кг. Як показано на Фіг. 7А, сполука із прикладу 1 має виражену протипухлинну активність, що характеризується профілем, що залежить від дози, що вводять пероральним шляхом. При введенні пероральним шляхом сполуки в дозі 100 мг/кг регрес пухлини був виявлений в 9/9 піддослідних мишей.

Результати аналізу методом Вестерн-блотингу, проведеного через 8 та 24 год. після введення 14-ої дози (по 10, 30 або 100 мг/кг) сполуки із прикладу 1 представлені на Фіг. 7Б і Фіг. 7В відповідно. Результати Вестерн-блотингу свідчать про те, що сполука в дозі 100 мг/кг інгібує фосфорилування MEK (що приводить до регресу пухлини), і що інгібування MEK зберігається протягом більше 24 год. після введення останньої дози, як продемонстровано на Фіг. 7В.

Як показано на Фіг. 7Г, аналіз модуляції біомаркерів, розташованих у напрямку поширення сигналу, у лізатах пухлини через 24 год. після введення 14-ої дози виявив збільшення рівнів BIM (маркер апоптозу) та p27Kip (маркер припинення клітинного циклу) і зменшення рівня цикліну D (інгібітор клітинного циклу). Ці результати підтверджують, що сполука із прикладу 1 інгібує передачу сигналу Raf у шляху MAPK.

Приклад 85

Обробка сполукою із прикладу 1 інгібує ріст пухлини меланоми

Інгібуючу активність сполуки із прикладу 1 тестували на моделі пухлини меланоми MEXF276 (що експресує мутантну B-Raf V600E) та моделі пухлини меланоми MEXF 1341, що експресує B-Raf дикого типу, мутантну N-Ras (Q61K).

Методи:

Отримані шляхом серійного пасажу пухлинні клітини людської меланоми MEXF276 (що екс-

пресують мутантну B-Raf V600E) імплантували підшкірно в задню пахову область 10-12-тижневим самкам мишей лінії Nu/Nu. Коли середній об'єм пухлин досягав приблизно 65 мм³, мишей розділяли довільно на групи та починали обробку сполукою із прикладу 1, тобто {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)аміном. Оскільки відомо, що модель із використанням MEXF276 викликає певну кахексію, при якій можна чекати виникнення деякої токсичності у необроблених контрольних мишей, то застосовували наступні режими дробового введення доз для того, щоб попереджати значну втрату ваги в групах, оброблених лікарським засобом. Мишам вводили перорально через зонд або тільки наповнювач, або сполуку із прикладу 1 відповідно до наступної схеми введення лікарського засобу: 10 мг/кг у дні 0, 2, 4, 6, 14, 16 та 20; 30 мг/кг у дні 0, 2, 14, 16 та 20; і 100 мг/кг у дні 0, 2, 14, 16 та 20. У моделі з використанням MEXF1341 отримані шляхом серійних пасажів пухлинні клітини людської меланоми MEXF1341 імплантували підшкірно в задню пахову область самкам мишей лінії Nu/Nu. Коли середній об'єм пухлин досягав приблизно 78 мм³, мишей розділяли довільно на групи та починали обробку сполукою із прикладу 1. Мишам вводили перорально через зонд або тільки наповнювач, або сполуку із прикладу 1 відповідно до наступної схеми введення лікарського засобу: 10 мг/кг у дні 0, 2, 4, 6, 12, 18 та 20; 30 мг/кг у дні 0, 2, 4, 6, 12, 18 та 20; і 100 мг/кг у дні 0, 2, 4, 6, 10, 12 та 20.

Через 4 год. після введення останньої дози мишей, на яких моделювали пухлини MEXF276 та MEXF1341, вмертвляли та пухлини видаляли та швидко заморожували. Потім лізати цих пухлин аналізували методом Вестерн-блотингу відносно модуляції мішені (pMEK, фосфорильована MEK) та модуляції маркерів, розташованих у напрямку поширення сигналу (BIM, p27Kip та pAKT) відповідно до способу, описаного в прикладі 84.

Результати:

На Фіг. 8А показаний графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин злоякісної меланоми лінії MEXF276 (B-Raf V600E) у мишей після обробки сполукою із прикладу 1. Результати, представлені на Фіг. 8А, демонструють, що сполука із прикладу 1 має виражену здатність інгібувати ріст пухлин MEXF276-ізолятів при використанні в дозі 10 мг/кг та приводить до регресу пухлини більш ніж 50% або на 50% у 8/8 мишей при використанні в дозі 30 мг/кг та 100 мг/кг. Аналіз фосфорилування pMEK (Фіг. 8Б) та в напрямку поширення сигналу та аналіз модуляції біомаркерів, розташованих у напрямку поширення сигналу, у лізатах пухлин (Фіг. 8В) підтвердив, що активність мутантної B-Raf інгібує в пухлинах лінії MEXF276, що видно по зниженню рівня фосфо-MEK на Фіг. 8Б. Як видно з Фіг. 8В, виявлене зниження рівня BIM (маркер апоптозу) і p27Kip (маркер припинення клітинного циклу) та зниження рівня фосфо-AKT (маркер шляху передачі сигналу виживання), що підтверджує інгібування кіназної активності в шляху MAPK.

На Фіг. 9А представлений графік, що свідчить про інгібування росту пухлин злоякісної меланоми лінії MEXF134 (N-Ras Q61K) у мишей після обробки сполукою із прикладу 1. Результати, представлені на Фіг. 9А, свідчать про те, що сполука із прикладу 1 викликала виражене інгібування росту пухлини (інгібування аж до 70%) на моделі меланоми, викликаної мутантом MEXF1341 N-Ras (N-Ras Q61K), при використанні в дозах 30 мг/кг та 100 мг/кг, але не індукувало регрес пухлини. Як видно з Фіг. 9Б, аналіз фосфо-МЕК через 20 днів після обробки сполукою в дозі 100 мг/кг дозволив встановити відсутність помітного зниження рівня фосфо-МЕК, на відміну від результатів, отриманих на моделі, у якій використовували лінію MEXF276 (мутант B-Raf). Крім того, хоча при використанні MEXF1341-моделі виявлений деякий вплив на молекули, що беруть участь у передачі сигналу, у шляху MAPK у напрямку його поширення після Raf, ця дія виявилася менш вираженою у порівнянні з виявленою при використанні MEXF276-моделі. Наприклад, як видно з Фіг. 9В, рівні p27Kip (маркер припинення клітинного циклу) зростали в групах, оброблених 30 мг/кг та 100 мг/кг, що свідчить про припинення росту, виявлене також деяке збільшення рівнів маркера апоптозу BIM. Таким чином, очевидно, що сполука із прикладу 1 має виражену активність на моделі ксенотранспланту MEXF276 (мутант B-Raf), викликаючи регрес пухлини, та помітно, але менш вираженою активністю на моделі ксенотранспланту MEXF1341 (B-Raf дикого типу, мутант N-Ras), викликаючи інгібування росту пухлин.

Приклад 86

Обробка сполукою із прикладу 1 інгібує ріст пухлини людської колоректальної карциноми

Оцінювали інгібуючу дію сполуки із прикладу 1 на моделях ксенотрансплантів колоректальної карциноми ліній HCT-116 (мутант K-Ras G13D), HT-29 (B-Raf V600E) та моделі гострого лейкозу з використанням ксенотрансплантату MV4-11 (FLT3 ITD).

Методи: 5×10^6 HCT-116 (мутант K-Ras G13D) клітин людської колоректальної карциноми імплантували підшкірно в задній пах 10-12-тижневих самок мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлин досяг приблизно 212 мм^3 , мишам вводили перорально через зонд або тільки наповнювач, або сполуку із прикладу 1 відповідно до наступної схеми введення лікарського засобу: 10 мг/кг, 30 мг/кг та 100 мг/кг перорально через зонд у день 1 і кожні 2 дні (q2d) всього протягом 28 днів. Захворілих мишей вмертвляли та пухлини видаляли через 4 год., 8 год. та 24 год. після введення 3-ої дози. Потім лізати пухлин аналізували за допомогою Вестерн-блотингу відносно модуляції мішені (pMEK) відповідно до способу, описаного вище в прикладі 84.

Другу модель людської колоректальної карциноми HT-29 (B-Raf V600E) аналізували в такий спосіб. 2×10^6 HT-29 клітин імплантували підшкірно в задній пах 10-12-тижневих самок мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм

пухлин досяг приблизно 167 мм^3 , мишам вводили перорально через зонд або тільки наповнювач, або сполуку із прикладу 1 відповідно до наступної схеми введення лікарського засобу: 10 мг/кг, 30 мг/кг та 100 мг/кг перорально через зонд у день 1 і кожні 2 дні (q2d) всього протягом 28 днів.

Модель ксенотрансплантату людського гострого мієлолейкозу MV4-11 (FLT3 ITD) оцінювали в такий спосіб: 5×10^6 клітин лінії MV4-11 імплантували підшкірно в задній пах 10-12-тижневих самок мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлин досяг приблизно 190 мм^3 , мишам вводили перорально через зонд або тільки наповнювач, або сполуку із прикладу 1 відповідно до наступної схеми введення лікарського засобу: 10 мг/кг, 30 мг/кг та 100 мг/кг перорально через зонд у день 1 і кожні 2 дні (q2d) всього протягом 16 днів. Мишей з додаткової (сателітної) групи вмертвляли та видаляли пухлини через 4 год. після введення 3-ої дози. Потім лізати пухлин аналізували за допомогою Вестерн-блотингу відносно модуляції мішені (pMEK) відповідно до способу, описаного вище в прикладі 84.

Результати:

Результати, отримані при використанні HCT-116, представлені на Фіг. 10А-Г. На Фіг. 10А показаний графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин колоректальної карциноми лінії HCT-116 (K-Ras G13D) у мишей оброблених 100 мг/кг сполуки із прикладу 1. Як видно з Фіг. 10Б-10Г, аналіз рівнів фосфо-МЕК через 4 год. (Фіг. 10Б), 8 год. (Фіг. 10В) та 24 год. (Фіг. 10Г) після 3-ої обробки свідчить про виражене зниження рівнів фосфо-МЕК.

На Фіг. 11 показаний графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин колоректальної карциноми лінії HT-29 (B-Raf V600E) у мишей оброблених сполукою із прикладу 1. Як видно з Фіг. 11, регрес пухлин виявлений при обробці дозою 30 мг/кг та 100 мг/кг.

Результати, отримані при використанні MV4-11, представлені на Фіг. 12А-Б. На Фіг. 12А показаний графік, що свідчить про рівень інгібування середнього росту злоякісних пухлин гострого мієлолейкозу лінії MV4-11 у мишей, оброблених сполукою із прикладу 1. Клітини пухлини лінії MV4-11 несли мутантний тирозинкіназний рецептор (MV4;11, FLT3 ITD). Встановлено, що сполука із прикладу 1 викликала виражене інгібування росту пухлини на моделі MV-11, однак не отримано даних ні про регрес пухлин (Фіг.12А), ні про помітне інгібування передачі сигналу MEK (Фіг. 12Б). Не вдаючись у теорію, можна припустити на основі даних, отриманих на MV4-11-моделі, що інгібування росту пухлин є результатом антиангіогенної активності сполуки, насамперед у результаті інгібування VEGFR-2, що буде описано нижче в прикладах 87-88.

Узагальнення результатів, отриманих при оцінці ефективності сполуки із прикладу 1 відносно меланоми, колоректальної карциноми та лейкозу, отримані при використанні описаних вище відповідних моделей ксенотрансплантів, представлені нижче в таблиці 7.

Таблиця 7

Узагальнення даних про активність сполуки із прикладу 1 на різних моделях ксенотрансплантатів

Модель ксенотрансплантату	Генотип	Вихідний об'єм пухлини	Доза (мг/кг)	Схема	TGI (інгібування росту пухлини/регрес
A375M(меланома)	B-Raf(V600E)	100 мм ³	10	qdx14	53% TGI
				q2dx14	33% TGI
			30	qdx14	78% TGI
				q2dx14	81% TGI
			100	qd	регрес
				q2dx14	регрес
MEXF-276 (меланома)	B-Raf (V600E)	65 мм ³	10	дні 0, 2, 4, 6, 14, 16, 20	80% GTI
			30	дні 0, 2, 14, 16, 20	регрес
			100	дні 0, 2, 14, 16, 20	регрес
HT29 (колоректальний рак)	B-Raf (V600E)	167 мм ³	10	q2dx14	12% TGI
			30	q2dx14	регрес
			100	q2dx14	регрес
MEXF-1341 (меланома)	N-Ras (wt/Q61K)	78 мм ³	10	дні 0, 2, 4, 6, 12, 18, 20	30% TGI
			30	дні 0, 2, 4, 6, 12, 18, 20	60% TGI
			100	дні 0, 2, 4, 6, 12, 20	71% TGI
HC-116 (колоректальний рак)	K-Ras (wt/G13D)	212 мм ³	10	q2dx14	33% TGI
			30	q2dx14	81% TGI
			100	q2dx14	регрес
MV4;11 (ОМЛ)	FLT3 ITD	190 мм ³	10	q2dx7	41% TGI
			30	q2dx7	55% TGI
			100	q2dx7	79% TGI

З даних, узагальнених у таблиці 7, представлених на Фіг. 6-12 та описаних у прикладах 82-86, видно, що сполука із прикладу 1 має ефективність при використанні всіх вивчених моделей ксенотрансплантатів, у яких є присутнім мутантна B-Raf, викликаючи регрес пухлин та модулювання мішеней при використанні всіх трьох вивчених моделей (A375M, MEXF276 та HT29).

Приклад 87

Аналізи інгібування тирозинкінази

1. Біохімічні аналізи:

Кіназну активність ряду протеїнтирозинкіназ оцінювали з використанням АТФ та відповідного пептиду або білку, що містить залишок амінокислоти тирозину, призначений для фосфорилування, та оцінюючи перенос фосфатного залишку на залишок тирозину. Реконбінантні білки, що відповідають цитоплазматичним доменам VEGFR2, PDGFR β , CSF-IR та c-Kit, одержували очищенням із клітин комах лінії Sf9, заражених відповідним реконбінантним експресійним бакуловірусним вектором, що несе людський VEGFR2, PDGFR β , CSF-IR та c-Kit. Для кожного аналізу сполуку із прикладу 1, тобто {1-метил-5-[2-(5-трифторметил-1H-імідазол-2-іл)-піридин-4-ілокси]-1H-бензімідазол-2-іл}-(4-трифторметилфеніл)амін, серійно розводили в ДМСО та потім змішували з відповідним реакційним буфером для кіназ, доповненим АТФ (застосовувана концентрація АТФ була трохи нижче відповідного значення Km). Додавали білок кінази та відповідний біотинільований пептидний суб-

страт для одержання кінцевого об'єму 50-100 мкл. Реакційні суміші інкубували протягом 1-3 год. при кімнатній температурі та потім реакцію припиняли, додаючи 25-50 мкл 45 мМ ЕДТК, 50 мМ Hepes, pH 7,5. Реакційну суміш, у якій була припинена реакція (75 мкл), переносили на сенсibilізований стрептавідином титрувальний мікропланшет (фірма Boehringer Mannheim) та інкубували протягом 1 год. Фосфорильований пептидний продукт оцінювали за допомогою флуоресцентної системи з часовим розділенням типу DELFIA (фірма Wallac або PE Biosciences) з використанням міченого європійем антитіла до фосфотирозину PT66, з модифікації, що полягає в тому, що буфер для аналізу, що входить у систему DELFIA, доповнювали 1 мМ MgCl₂ для розведення антитіла. Флуоресценцію з часовим розділенням вимірювали за допомогою флуориметра типу Wallac 1232 DELFIA або рідера безлічі сигналів (багатоканального рідера) типу PE Victor II. Концентрацію кожної сполуки, що викликає 50%-не інгібування (IC₅₀), розраховували за способом нелінійної регресії за допомогою програми для аналізу даних XL Fit.

Кіназну активність VEGFR2 (0,05 мкг/мл) оцінювали в буфері, що містить 50 мМ Hepes, pH 7,0, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ MnCl₂, 1 мМ Na, 1 мМ дитіотреїтол (ДТТ), 1 мг/мл бичачі сироваткові альбуміни (БСА), від 1 до 30 мкМ АТФ та 0,25 мкМ біотинільований пептидний субстрат «GGGGQDGKDYIVLPi» (SEQ ID NO:1).

Для оцінки кіназної активності PDGFR вико-

ристовували 120 мкг/мл ферменту в поєднанні з тим же самим буфером, що описаний вище, за винятком зміни концентрацій АТФ і пептидного субстрату на 1,4 мкМ АТФ та 0,25 мкМ біотинільований пептидний субстрат «GGGGQDGKDYIVLPI» (SEQ ID NO:1).

Кіназну активність CSF-IR оцінювали в буфері для аналізу (50 мМ HEPES, pH 7,0, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ MnCl₂, 0,1% БСА, 1 мМ ДТТ, 0,01% Твін, кінцеве значення pH 7,5), з використанням 1 мкМ АТФ та 50 нМ біотинільованого пептидного субстрату «EEEEAYGWLNF» (SEQ ID NO:2).

Кіназну активність c-Kit оцінювали з використанням АТФ та рекомбінантного білку, що відповідає цитоплазматичному домену рецептора c-Kit (отриманому від фірми Proquinase). Білок кінази c-Kit (2 нМ) та біотинільований пептидний субстрат (1 мкМ) «GGLFDDPSWNVQNL» (SEQ ID NO:3), додавали в реакційний буфер, доповнений АТФ (8 мкМ) для одержання кінцевого об'єму 100 мкл. Реакційний буфер для c-Kit включав 50 мМ HEPES pH 7,5, 1 мМ NaF, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ MnCl₂ та 1 мг/мл БСА. Реакційну суміш інкубували протягом 2 год. при кімнатній температурі та потім реакцію припиняли, додаючи 50 мкл 45 мМ

ЕДТК, 50 мМ HEPES, pH 7,5. Реакційну суміш, у якій була припинена реакція (75 мкл), переносили на сенсibiliзований стрептавідином титраційний мікропланшет (фірма Boehringer Mannheim) та інкубували протягом 1 год. Фосфорильований пептидний продукт оцінювали за допомогою флуоресцентної системи з часовим розділенням типу DELFIA (фірма Wallac або PE Biosciences) з використанням міченого європідем антитіла до фосфотирозину PT66, з модифікацій, що полягає в тому, що буфер для аналізу, що входить у систему DELFIA, доповнювали 1 мМ MgCl₂ для розведення антитіла. Флуоресценцію з часовим розділенням вимірювали за допомогою флуориметра типу Wallac 1232 DELFIA та багато-канального рідера типу PE Victor II. Концентрацію кожної сполуки, що викликає 50%-не інгібування (IC₅₀), розраховували за способом нелінійної регресії за допомогою програми для аналізу даних XL Fit.

Результати: Як видно із представленої нижче таблиці 8, сполука із прикладу 1 є сильним інгібітором VEGFR-2, c-Kit, PDGFR-β та CSF-IR.

Таблиця 8

Інгібування тирозинкіназ сполукою із прикладу 1

Мішень	Сполука із прикладу 1 IC ₅₀ на основі біохімічного аналізу	Сполука із прикладу 1 EC ₅₀ на основі клітинного аналізу
VEGFR-2	0,07 мкМ	0,03 мкМ
c-Kit	0,0	1,1 мкМ
PDGFR-β	0,0032 мкМ	0,7 мкМ
CSF-IR	0,20 мкМ	н. в.

Для оцінки активності сполуки із прикладу 1 відносно молекул-мішеней, представлених у таблиці 8, використовували також наступні аналізи, основані на застосуванні клітин.

Оцінка модуляції мішеней у клітинах лінії HMVEC після обробки сполукою із прикладу 1 свідчила про інгібування опосередкованого VEGF фосфорильовання VEGFR-2, що характеризувалося значенням EC₅₀ 0,03 мкМ, при оцінці зниження рівнів фосфо-VEGFR за допомогою аналізу методом Вестерн-блотингу (дані не представлені).

Аналіз інгібування c-Kit з використанням клітин лінії Mo7e після обробки сполукою із прикладу 1 свідчив про інгібування фосфорильовання c-Kit, що характеризувалося значенням EC₅₀ 1,1 мкМ, при оцінці зниження рівнів фосфо-c-Kit за допомогою ELISA.

Аналіз інгібування PDGFR-β з використанням клітин лінії MG63 після обробки сполукою із прикладу 1 свідчив про інгібування фосфорильовання PDGFR-β, що характеризувалося значенням EC₅₀ 0,7 мкМ, при оцінці зниження рівнів фосфо-PDGFR-β за допомогою ELISA.

Приклад 88

Інгібування ангіогенезу

Для додаткового вивчення впливу сполуки із прикладу 1 на VEGFR-2 оцінювали сполуку на

моделі CHO-VEGF з використанням як носій матригелю (Matrigel)).

Методи: 110 мишей лінії Nu/Nu (n=10 осіб/групу) піддавали акліматизації протягом 1 тижня перед початком дослідження. 5×10⁶ VEGF-CHO-клітини в 0,5 мл матригелю вводили ін'єкцією в день 1 підшкірно у верхню частину черевної області мишей. У день 1 мишам вводили перорально або наповнювач, або сполуку із прикладу 1 у дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг або 100 мг/кг, використовуючи схему введення лікарського засобу qdx5. Через 5 днів матригель видаляли з організму мишей та оцінювали концентрацію гемоглобіну.

Результати:

На Фіг. 13 показаний графік, що свідчить про інгібування опосередкованого VEGF ангіогенезу, при використанні як модель CHO-VEGF-матригеля після обробки сполукою із прикладу 1 у дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг та 100 мг/кг. Як видно з Фіг 13, введення зазначених доз сполуки протягом 5 днів приводило до істотного інгібування опосередкованого VEGF ангіогенезу.

Приклад 89

Роль схеми застосування лікарського засобу

Дослідження по оцінці ролі схеми застосування сполуки із прикладу 1 проводили на моделі ксенотрансплантатів людської мієломи лінії A375M

для виявлення залежності інгібування мутантної B-Raf, відповіді пухлини від концентрації сполуки в плазмі. Як видно з Фіг. 7А, при використанні сполуки із прикладу 1 на А375М-моделі виявлена чітка залежність відповіді від дози. Результати, представлені на Фіг. 7А, свідчать про те, що сполука із прикладу 1 індукує регрес пухлин при щоденному введенні дози 100 мг/кг, і цей регрес пухлин пов'язаний з помітним інгібуванням мутантної B-Raf (про що свідчить зниження рівнів фосфо-МЕК на Фіг. 7Б). Однак при використанні зазначеної схеми застосування сполуки із прикладу 1 у дозах 30 мг/кг та 100 мг/кг не досить добре переносилося мишами, оскільки до 14 дня виявлена втрата мишами в середньому 10% від їхньої первісної ваги. Тому найбільш ефективну дозу 100 мг/кг додатково оцінювали за допомогою описаних нижче методів.

Способи:

Аналогічно способу, описаному в прикладі 84, 3×10^6 клітин людської меланоми лінії А375М імплантували підшкірно в правий бік 10-12-тижневих самок мишей лінії Nu/Nu вагою приблизно 24 г. Коли середній об'єм пухлини досяг приблизно 200 мм³, мишей розподіляли довільно залежно від об'єму пухлини на чотири групи по дев'ять мишей у кожній та починали обробку сполукою із прикладу 1. Мишам вводили протягом 32 днів пероральним шляхом через зонд або тільки носій, або сполуки із прикладу 1 з використанням наступної схеми застосування: 100 мг/кг за схемою q2d, q3d або q4d протягом 28 днів.

В цьому дослідженні обробляли додаткові (сателітні) групи мишей, що несуть пухлини, для моніторингу модуляції мішеней у пухлині. Одержували зразки пухлин і плазми з організму мишей

через різні проміжки часу після введення 5-ої дози в групі, обробленій за схемою q2d, і після введення 3-ої дози в групі, обробленій за схемою q4d. Пухлини підготовляли для аналізу за допомогою Вестерн-блотингу рівнів фосфо-МЕК відповідно до способу, описаного в прикладі 84, а зразки плазми виділяли для оцінки рівнів лікарського засобу.

Результати:

На Фіг. 14 показаний графік, що свідчить про зниження середнього об'єму пухлин меланоми лінії А375М у мишей, оброблених 100 мг/кг сполуки із прикладу 1, при схемі застосування q2d, q3d або q4d. Як видно з Фіг. 14А, сполуку із прикладу 1 при її пероральному введенні в дозі 100 мг/кг при схемі застосування q2d, q3d або q4d мало виражену ефективність. Результати, отримані за допомогою аналізу методом Вестерн-блотингу, представлені на Фіг. 14Б, свідчать про те, що в пухлинах мишей, оброблених сполукою, виявлені знижені рівні фосфо-МЕК у порівнянні із групами, обробленими наповнювачем, аж до 48 год. після обробки при застосуванні схеми q2d. У зразках, отриманих з мишей, оброблених за схемою q4d, через 72 год. тільки в одній із трьох пухлин виявлені знижені рівні фосфо-МЕК, а через 96 год. у всіх зразках, отриманих з оброблених сполукою мишей, рівні фосфо-МЕК у пухлинах були порівнянними з рівнями, виявленими в пухлинах, оброблених наповнювачем. Ці результати узгоджуються з результатами, отриманими при використанні схеми застосування q2d, які представлені на Фіг. 7Б.

Як видно з таблиці 9, схеми застосування q3d та q4d краще переносилися піддослідними мишами при оцінці за втратою ваги.

Таблиця 9

Вивчення ролі схеми застосування сполуки
із прикладу 1 при використанні в дозі 100 мг/мл на моделі ксенотрансплантату А375М

Схема застосування: (100 мг/кг сполуки із прикладу 1 на дозу)	Середня втрата ваги тіла до 28 дня	TGI/регрес
q2d	12%	Регрес пухлин щонайменше на 50% в 10/10 випадків пухлин
q3d	8%	Регрес пухлин щонайменше на 50% в 7/10 випадків пухлин
q4d	7%	Регрес щонайменше на 50% в 3/10 випадків пухлин

На закінчення необхідно відзначити, що при спільному розгляді даних про модуляцію мішеней та даних про ефективність, очевидно, що схеми застосування q2d або q3d приводять до більш високої ефективності у відношенні регресу пухлин і характеризуються максимальною переносимістю хазяїном.

Приклад 90

Вивчення концентрації мішеней у плазмі

Відповідно до способу, описаного в прикладі 89, одержували зразки сироватки з мишей, оброблених сполукою із прикладу 1. Визначали концентрації лікарського засобу в зразках, отримані результати у вигляді залежності концентрації

сполуки від часу представлені на Фіг. 15. Із представленого на Фіг. 15 графіку, можна визначати граничну концентрацію лікарського засобу, необхідну для модуляції мішеней, з урахуванням даних про модуляцію мішеней, представлених на Фіг. 14А та Фіг. 14Б. Як видно з Фіг. 14Б, в усі вивчені моменти часу аж до 48 год. після обробки, рівні фосфо-МЕК знижувалися в оброблених сполукою пухлинах у порівнянні з пухлинами, обробленими наповнювачем, таким чином, відповідні концентрації лікарського засобу повинні являти собою концентрації, що перевищують це граничне значення. Як видно з Фіг. 14В, через 72 та 96 год. після обробки не виявлено модуляції

мішеней і таким чином, відповідні концентрації лікарського засобу повинні являти собою концентрації, що є меншими цього граничного значення. На закінчення необхідно відзначити, що поріг сполуки визначений на рівні приблизно від 50000 до 80000 нг/мл, приблизно 70000 нг/мл (135 мкМ).

Важливо відзначити, що концентрація мішеней у плазмі, визначена при використанні описаних вище досліджень за допомогою ксенотрансплантованих мишей, приблизно в 1000 разів перевищує значення EC_{50} , що характеризує модуляцію мішеней при використанні клітин лінії A375M (0,16 мкМ) *in vitro* (див. таблицю 5). Це розходження можна в основному пояснити зв'язуванням білку в плазмі, оскільки більше 99,9% сполуки із прикладу 1 зв'язується білком у плазмі. З урахуванням цього, відповідно до грубого розрахунку концентрація вільного лікарського засобу

становить приблизно 0,135 мкМ, що близьке значенню EC_{50} *in vitro*, що становить 0,16 мкМ, визначеному в дослідженнях по модуляції мішеней з використанням клітин лінії A375M.

Для додаткового пояснення впливу зв'язування білком плазми на активність сполуки із прикладу 1 здійснювали серії експериментів *in vitro*, у яких сполуку попередньо інкубували в 50%-ній сироватці, взятій в мишей, щурів, собак, мавп або людини, і потім обробляли клітини лінії A375M або клітини лінії Mo7e. Визначали рівні фосфо-MEK та фосфо-ERK у клітинах лінії A375M (для оцінки інгібування мутантної B-Raf) після інкубації протягом ночі. Визначали рівні фосфо-c-Kit у клітинах лінії Mo7e (для оцінки інгібування c-Kit) після інкубації протягом 4 год. Результати цих аналізів узагальнені нижче в таблиці 10.

Таблиця 10

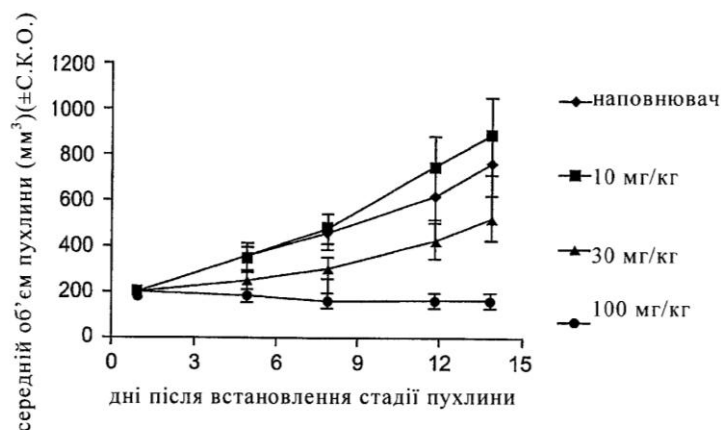
Вплив сироватки з різних видів на активність сполуки із прикладу 1

Види	Фосфо-MEK EC_{50} (мкМ)	Фосфо-ERK EC_{50} (мкМ)	Фосфо-c-Kit EC_{50} (мкМ)
миша	153±15,3	160±27	126±22
щур	24±5,7	37±7,0	29±6,4
собака	18±2,4	20±2,8	н. в.
мавпа	9±3,3	13±0,9	н. в.
людина	15±1,5	20±5,0	16±1,5

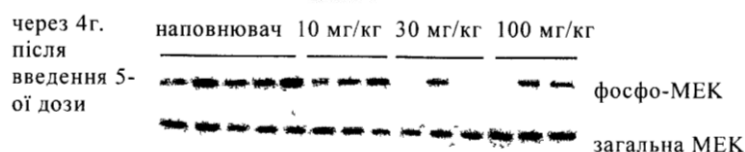
Дані, представлені в таблиці 10, можна використати для оцінки відносного зв'язування сполуки із прикладу 1 з білками плазми різних видів та як основу для корекційного фактору для екстраполяції даних про концентрацію мішеней у плазмі мишей на інші види. Наприклад, на основі цих даних можна встановити, що концентрація міше-

ней у плазмі щурів приблизно в 5 разів нижче, ніж у мишей, а концентрація мішеней у плазмі людини приблизно в 10 разів нижче, ніж у мишей.

Хоча вище проілюстровані та описані кращі варіанти здійснення винаходу, повинно бути очевидним, що різні зміни можуть бути внесені без відхилення від сутності та обсягу винаходу.



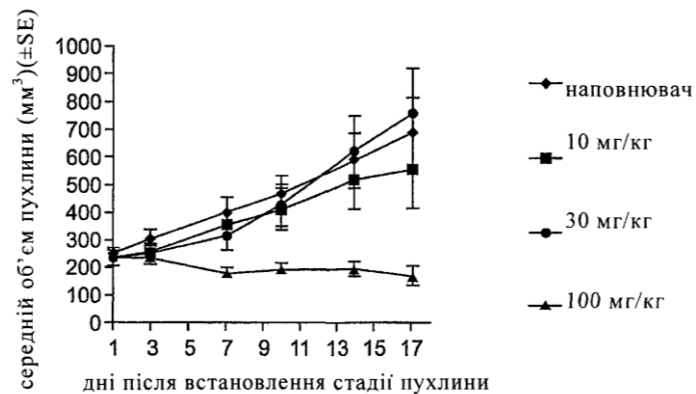
Фіг. 1



Фіг. 2A

через 24 г. наповнювач 10 мг/кг 30 мг/кг 100 мг/кг
 після фосфо-МЕК
 введення 5-ої дози загальна МЕК

Фіг. 2Б



Фіг. 3

через 1 год. наповнювач 10 мг/кг 30 мг/кг 100 мг/кг
 після фосфо-МЕК
 введення 5-ої дози загальна МЕК

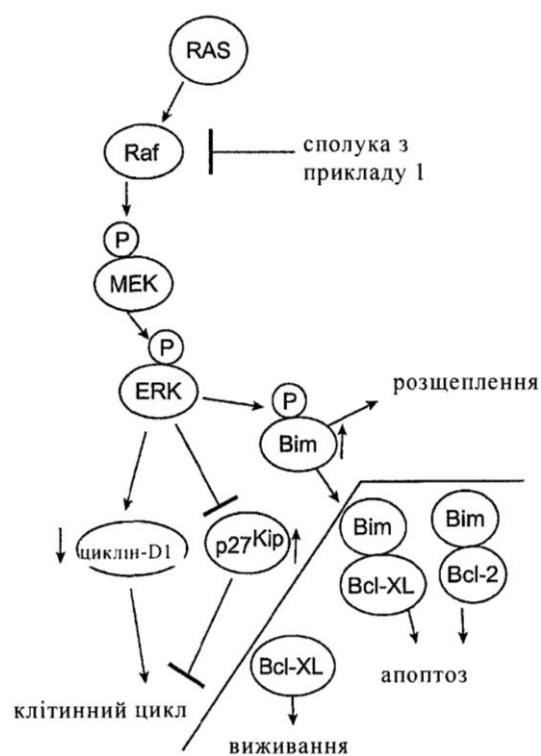
Фіг. 4А

через 4 год. наповнювач 10 мг/кг 30 мг/кг 100 мг/кг
 після фосфо-МЕК
 введення 5-ої дози загальна МЕК

Фіг. 4Б

через 24 год. наповнювач 10 мг/кг 30 мг/кг 100 мг/кг
 після фосфо-МЕК
 введення 5-ої дози загальна МЕК

Фіг. 4В

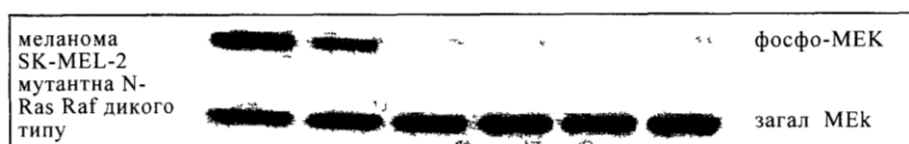


Фіг. 5

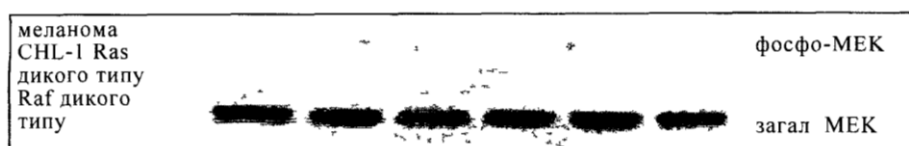
ДМСО 01мкМ 0,5мкМ 1мкМ 5мкМ 10мкМ



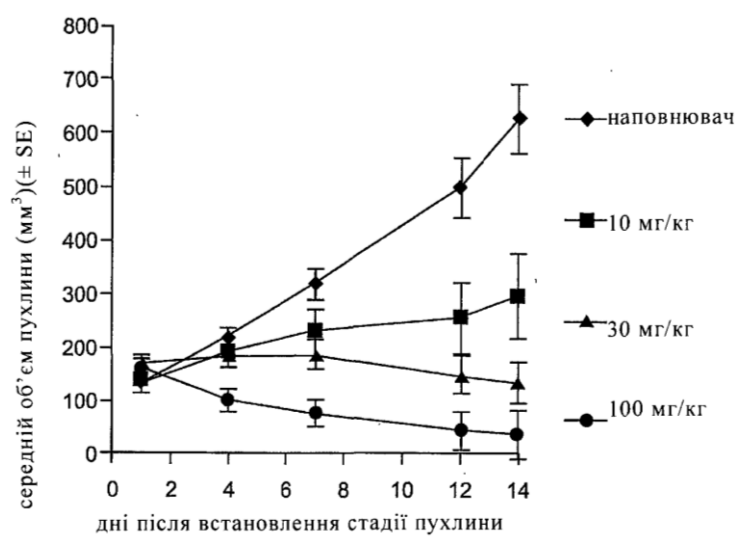
Фіг. 6А



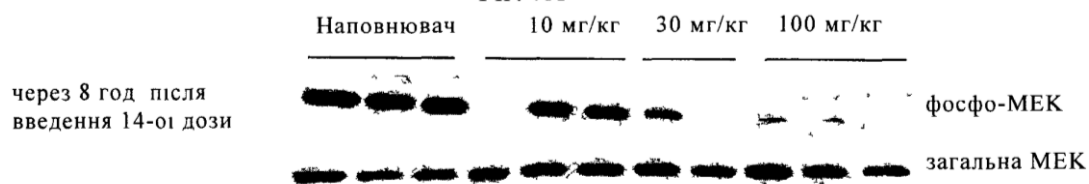
Фіг. 6Б



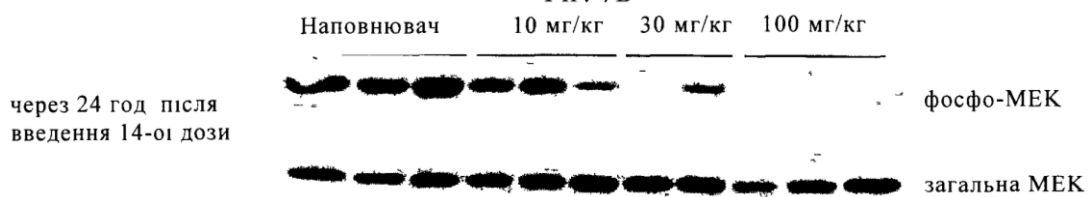
Фіг. 6В



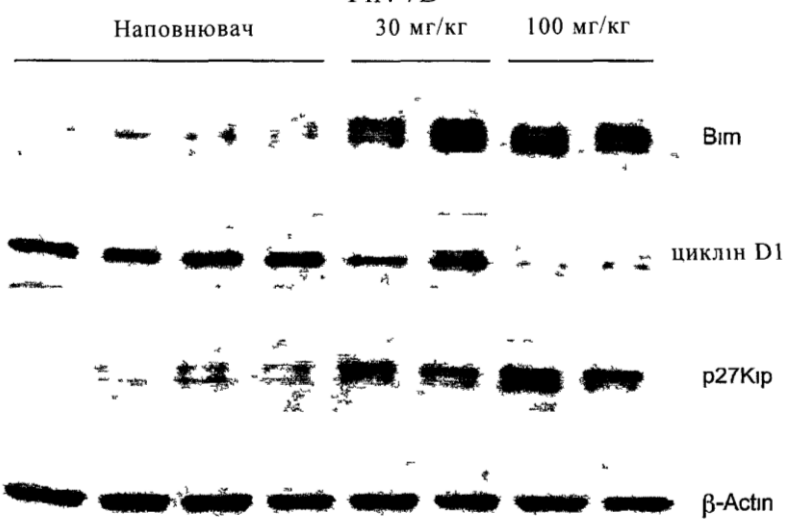
Фіг. 7А



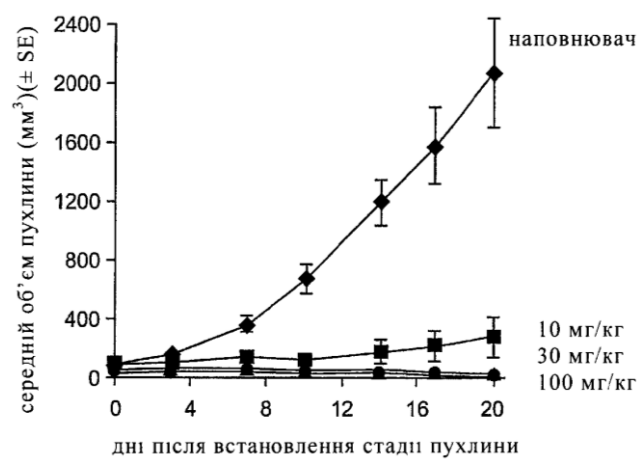
Фіг. 7Б



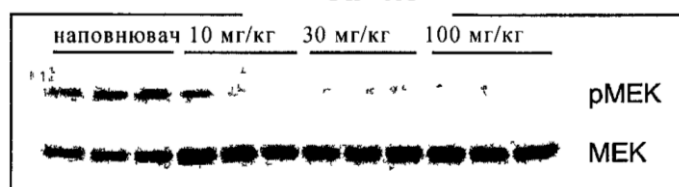
Фіг. 7В



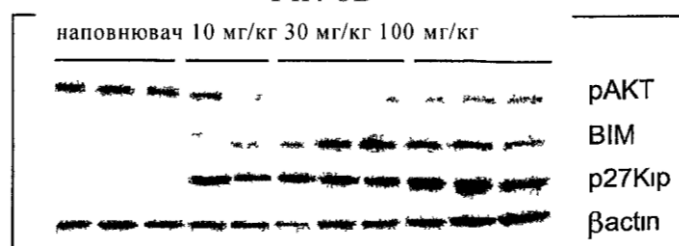
Фіг. 7Г



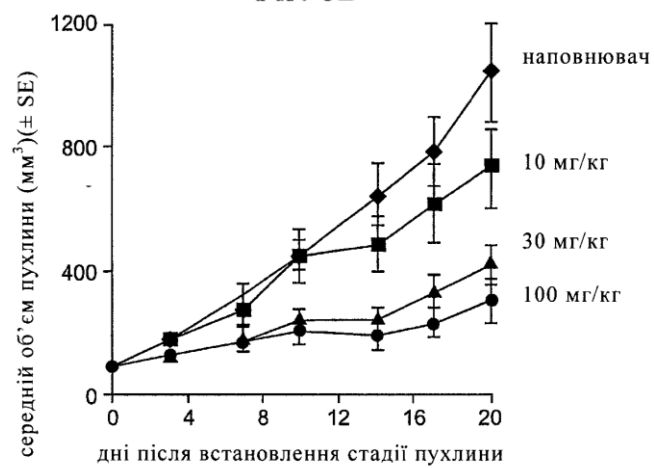
Фіг. 8А



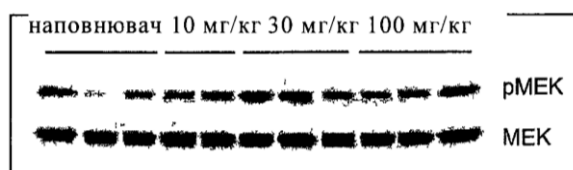
Фіг. 8Б



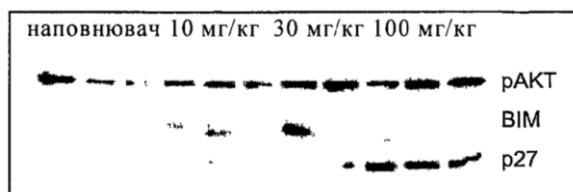
Фіг. 8В



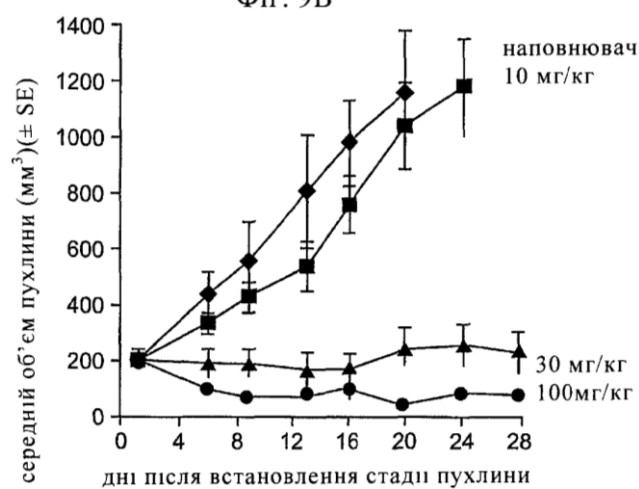
Фіг. 9А



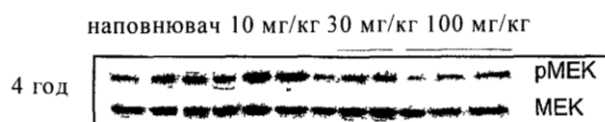
Фіг. 9Б



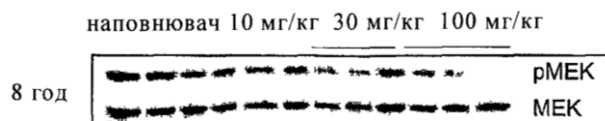
Фіг. 9В



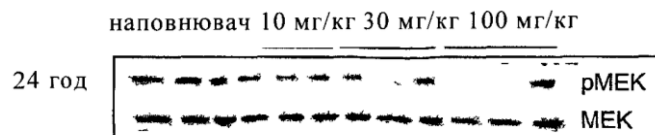
Фіг. 10А



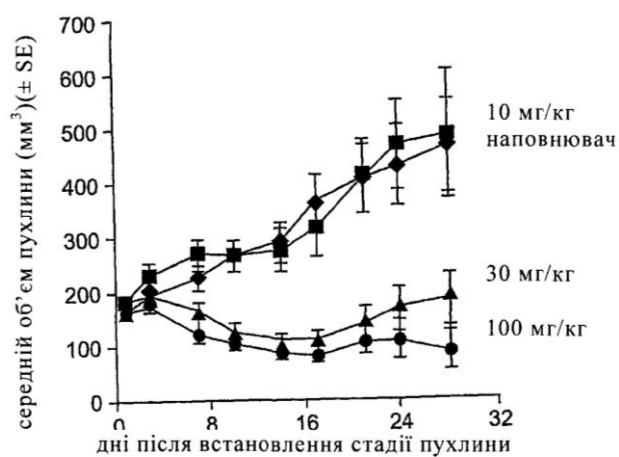
Фіг. 10Б



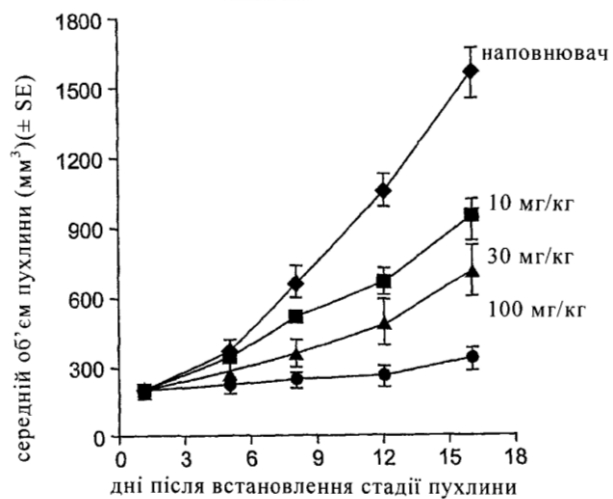
Фіг. 10В



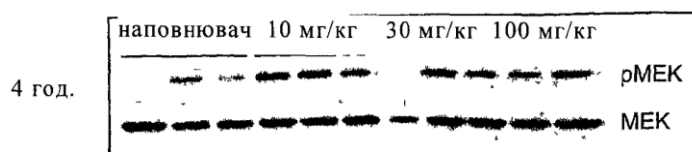
Фіг. 10Г



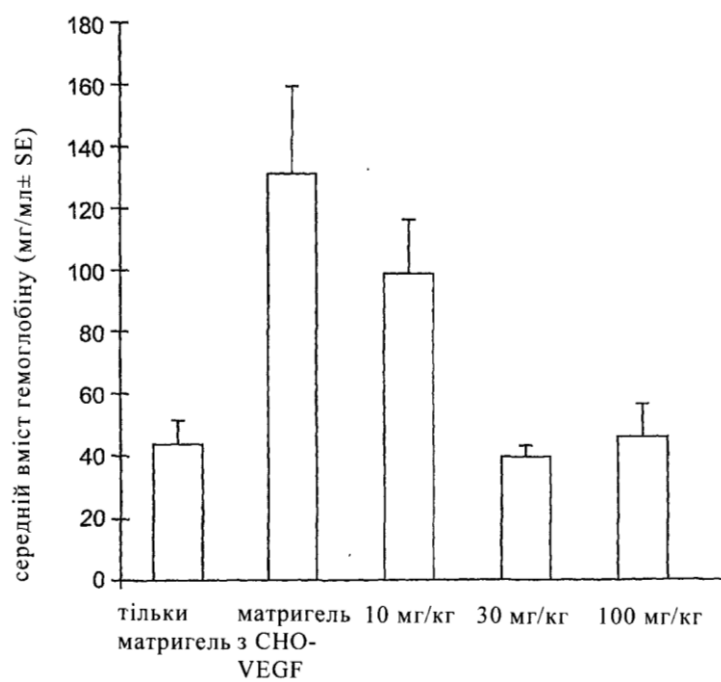
Фіг. 11



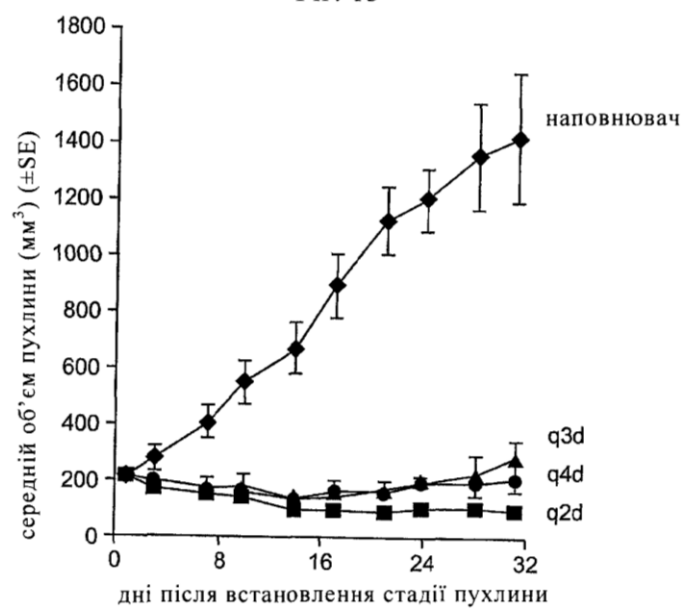
Фіг. 12А



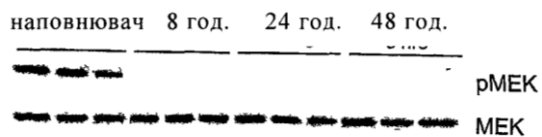
Фіг. 12Б



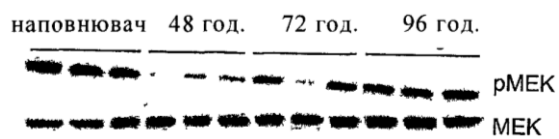
Фіг. 13



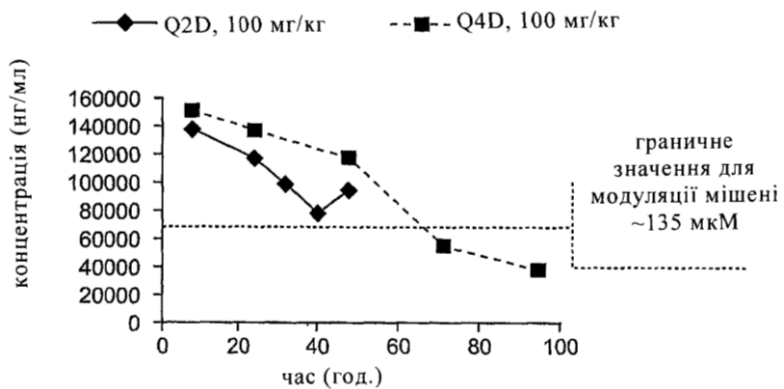
Фіг. 14А



Фіг. 14Б



Фіг. 14В



Фіг.15