



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80571** (13) **C2**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61K 31/4709**  
**A61P 35/00**  
**C07D 487/04**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

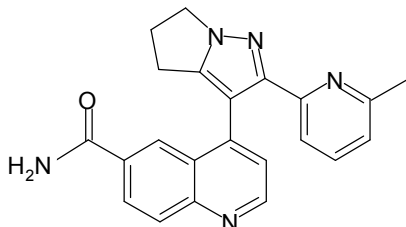
## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ХІНОЛІНІЛПІРОЛОПІРАЗОЛИ

1

2

(21) a200504767  
(22) 10.11.2003  
(24) 10.10.2007  
(86) PCT/US03/32747, 10.11.2003  
(31) 60/428,893  
(32) 22.11.2002  
(33) US  
(72) БЕЙТ ДУГЛАС УЕЙД, СОЙЕР ДЖЕЙСОН  
СКОТТ, ІНГЛІНГ ДЖОНАТАН МАЙКЛ  
(73) ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ  
(56) EP 0531901 A  
(57) 1. Сполука формули II



Формула II

та її фармацевтично прийнятні солі.

2. Сполука, яка являє собою 2-(6-метилпіридин-2-іл)-3-(6-амідохінолін-4-іл)-5,6-дигідро-4H-піроло[1,2-b]піразол, та її фармацевтично прийнятні солі.

3. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за п. 1 або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір або проліки разом із фармацевтично прийнятним розріджувачем, наповнювачем або носієм.

4. Сполука за п. 1 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування у способі лікування людини або тварини.

5. Застосування сполуки за п. 1 або її фармацевтично прийнятної солі для лікування раку.

Цей винахід стосується нових сполук - похідних хінолінілпіразолу та їх застосування як фармацевтичних агентів, зокрема, їх використання як інгібіторів передачі сигналу TGF- $\beta$ .

Поліпептиди бета-фактора трансформації росту (TGF-бета, TGF- $\beta$ ) впливають на ріст, диференціацію численних типів клітин та на експресію генів у них. Перший ідентифікований поліпептид цієї групи, TGF- $\beta$ 1, містить дві ідентичні субодиниці зі 112 амінокислот, з'єднані ковалентно. TGF- $\beta$ 1 є висококонсервативним протеїном, його різновиди, характерні для організмів людини та миші, відрізняються один від одного єдиною амінокислотою. В організмах ссавців експресуються два інших члени генного сімейства TGF- $\beta$ . TGF2 є гомологічним з TGF- $\beta$ 1 на 71% [де-Мартін та ін. - de Martin et al., (1987) EMBO J. 6: 3673-3677], тоді як TGF- $\beta$ 3 є гомологічним з TGF- $\beta$ 1 на 80% [Деринк та ін. - Derynck et al., (1988) EMBO J. 7: 3737-3743].

Структурні характеристики TGF- $\beta$ 1, визначені методом ядерного магнітного резонансу [Арчер та ін. - Archer et al., (1993) Biochemistry 32:1164-1171] узгоджуються з кристалічною структурою TGF- $\beta$ 2 [Даопін та ін. - Daopin et al., (1992) Science 257:369-374; Шлунеггер та Груттер - Schlunegger and Grutter (1992) Nature 358:430-434].

Існують щонайменше три різних позаклітинних рецептори TGF- $\beta$  тину I, типу II та типу III, які беруть участь у біологічних функціях TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 та - $\beta$ 3 [огляд інформації див. Деринк - Derynck (1994) TIBS 19: 548-553 та Maccag - Massague (1990) Ann. Rev. Cell Biol. 6: 597-641]. Рецепторами типу I та типу II є трансмембранні серин/треонін-кінази, які у присутності TGF- $\beta$  утворюють гетеромерний сигнальний комплекс [Врана та ін. - Wram et al., (1992) Cell 71:1003-1014].

З'ясовано механізм активації цього гетеромерного сигнального комплексу на поверхні

(13) **C2**

(11) **80571**

(19) **UA**

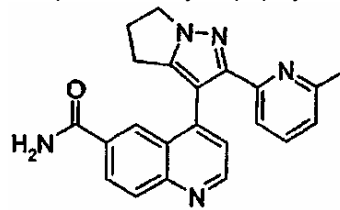
клітин [Врана та ін. - Wrana et al., (1994) Nature 370: 41-347]. Спочатку TGF- $\beta$  зв'язує рецептор типу II, який є конститутивно активною трансмембранною серин/треонін-кіназою. Потім до комплексу залучається рецептор типу I, який фосфорилується на домені GS та активується для фосфорилювання подальших сигнальних компонентів (наприклад, протеїнів Smad) для ініціювання внутрішньоклітинного сигнального каскаду. Показано, що конститутивно активний рецептор типу I (мутант T204D) ефективно передає реакції TGF- $\beta$ , компенсуючи таким чином потребу у TGF- $\beta$  та рецепторі типу II [Візер та ін. - Wieser et al., (1995) EMBO J. 14: 2199-2208]. Хоча сигнальних функцій рецептора типу III не виявлено, він підвищує спорідненість TGF- $\beta$ 2 до рецептора типу II, забезпечуючи ефективність цього ферменту, практично однаковою з активністю TGF- $\beta$ 1 та TGF- $\beta$ 3 [Лопес-Касильяс та ін. - Lopez-Casillas et al., (1993) Cell 73: 1435-1444].

У клітинах судинного ендотелію рецептор типу III відсутній. Замість нього клітини ендотелію експресують структурно подібний протеїн, що має назву ендоглін [Хейфец та ін. - Cheifetz et al., (1992) J. Biol. Chem. 267: 19027-19030], який зв'язує тільки TGF- $\beta$ 1 та TGF- $\beta$ 3 з високою спорідненістю. Таким чином, відносна ефективність TGF- $\beta$  відображає тип рецепторів, експресованих у системі клітини та органу. Окрім регулювання компонентів у багатофакторному сигнальному шляху, розподіл синтезу поліпептидів TGF- $\beta$  впливає також на фізіологічну функцію. Розподіл TGF- $\beta$ 2 та TGF- $\beta$ 3 більш обмежений [Деринк та ін. - Derynck et al., (1988) EMBO J. 7: 3737-3743] у порівнянні з TGF- $\beta$ 1, наприклад, присутність TGF- $\beta$  обмежена тканинами мезенхімального походження, тоді як TGF- $\beta$ 1 присутній у тканинах як мезенхімального, так і епітеліального походження.

TGF- $\beta$ 1 є багатофункціональним цитокіном, який відіграє вирішальну роль у відновленні тканин. Високі концентрації TGF- $\beta$ 1 постачаються до місця пошкодження гранулами тромбоцитів [Ассоуян та Спорн - Assoian and Sporn (1986) J. Cell Biol. 102: 1217-1223]. TGF- $\beta$ 1 ініціює послідовність явищ, які сприяють загоєнню, в тому числі хемотаксис клітин, наприклад, лейкоцитів, моноцитів та фібробластів, та регуляцію факторів росту та цитокінів, які беруть участь в ангіогенезі, поділ клітин, пов'язаний з відновленням тканини, та запальні реакції. TGF- $\beta$ 1 також стимулює синтез компонентів позаклітинної матриці [Роберте та ін. - Roberts et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4167-4171; Спорн та ін. - Sporn et al., (1983) Science 219: 1329-1330; Maccar - Massague (1987) Cell 49: 437-438] і - що має важливе значення для розуміння патофізіології TGF- $\beta$ 1 - TGF- $\beta$ 1 забезпечує авторегуляцію свого синтезу [Кім та ін. - Kim et al., (1989) J. Biol. Chem. 264: 7041-7045].

Сполуки, розкриті в цьому описі, здатні інгібувати також активність інших кіназ, наприклад, p38-кінази та/або KDR (VEGFR2) кінази. Випробування для визначення активності таких кіназ відомі вг сузі, і фахівець може випробувати розкриті сполуки на таку активність.

Розкритий винахід стосується також конкретної сполуки формули II



Формула II

2-(6-метилпіридин-2-іл)-3-(6-амідохінолін-4-іл)-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-б]піразол та його фармацевтично прийнятних солей.

Вищевказану сполуку розкрито у загальному вигляді та заявлено [у заявці PCT/US02/11884, поданій 13 травня 2002р.], яка претендує на пріоритет заявки на [патент США №60/293,464, поданої 24 травня 2001р.], і яку включено до цього опису шляхом посилання. Вищевказану сполуку вибрано з урахуванням її неочікувано значно більш сприятливого токсикологічного профілю у порівнянні зі сполуками, конкретно розкритими у вищезгаданій заявці.

Термін "ефективна кількість", вжитий, наприклад, у словосполученні "ефективна кількість сполуки формули I", означає кількість сполуки за цим винаходом, здатну інгібувати TGF- $\beta$ .

Позначення "мкМ" ( $\mu$ M) означає "мікромолярний".

Загальні хімічні терміни вживаються в цьому описі у своїх звичайних значеннях.

У всіх схемах синтезів та прикладах вжито такі аббревіатури:

DMF (ДМФ) - диметилформамід

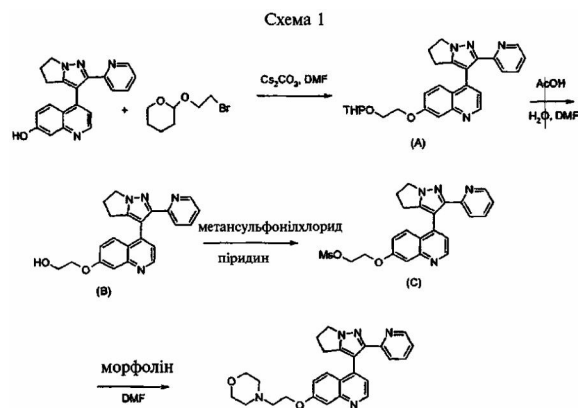
THF (ТГФ) - тетрагідрофуран

Ms - месил, тобто метилсульфоніл

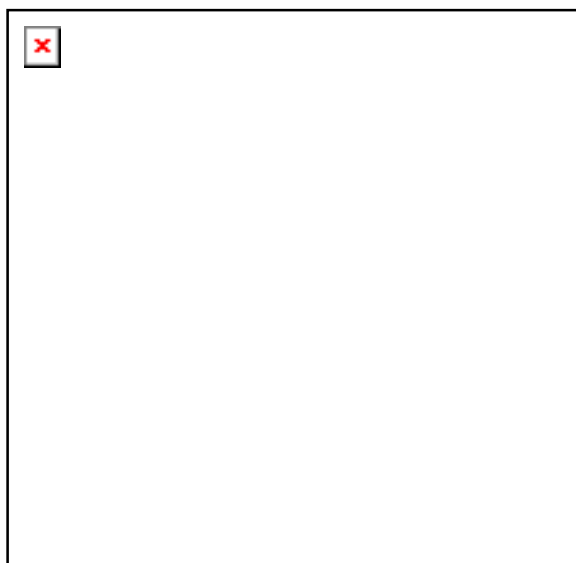
THP (ТГП) - тетрагідропіран

Сполуки, розкриті в цьому описі, можна одержати за поданими нижче схемами та прикладами. Приклади в жодному разі не слід розуміти як такі, що будь-яким чином обмежують можливі способи одержання відповідних сполук.

Подана нижче схема ілюструє одержання сполуки формули I.



Подана нижче схема ілюструє одержання сполуки формули II.



Подані нижче приклади більш детально ілюструють процеси одержання сполук за цим винаходом, схематично показані на Схемі I та Схемі II.

Приклад 1 Одержання 7-(2-морфолін-4-іл-етокси)-4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-хіноліну

А. Одержання 4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-7-[2-(тетрагідропіран-2-ілокси)етокси]хіноліну

4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-хінолін-7-ол (376мг, 1,146ммоль), карбонат цезію (826мг, 2,54ммоль) та 2-(2-брометокси)-тетрагідро-2Н-піран (380мкл, 2,52ммоль) у ДМФ (5мл) нагрівали при 120°C протягом 4год. Гасили реакційну суміш насиченим розчином хлориду натрію, після чого екстрагували хлороформом. Органічний шар сушили над сульфатом натрію і концентрували у вакуумі. Реакційну суміш очищали на колонці із силікагелем з елюванням при зміні складу елюенту від дихлорметану до 10% метанолу в дихлорметані, і одержували проміжний продукт, вказаний у підзаголовку, у вигляді жовтого масла (424мг, 81%). Мас-спектр (MS ES<sup>+</sup>) *m/e* 457,0 (M+1).

В. Одержання 2-[4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-хінолін-7-ілокси]-етанолу

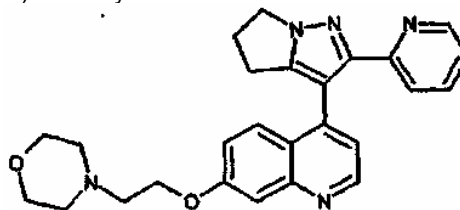
Нагрівали розчин 4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-7-[2-(тетрагідропіран-2-ілокси)етокси]хіноліну (421мг, 0,92ммоль) у суміші оцтової кислоти, тетрагідрофурану та води (4:2:1) (20мл). Видаляли розчинник у вакуумі і екстрагували залишок сумішшю хлороформу з ізопропіловим спиртом (3:1). Органічний шар промивали насиченим розчином бікарбонату натрію і сушили над сульфатом натрію. Концентрували у вакуумі. Залишок був досить чистим для застосування на наступній стадії згідно зі схемою (425мг, 100%). MS ES<sup>+</sup> *m/e* 373,1 (M+1).

С. Одержання 2-[4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-хінолін-7-ілокси]-

етилового складного ефіру метансульфонові кислоти

Розчин 2-[4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-хінолін-7-ілокси]-етанолу (293мг, 0,78ммоль) та метансульфонілхлориду (68мкл, 0,81ммоль) у безводному піридині (5мл) перемішували протягом 2год. Видаляли піридин у вакуумі, і екстрагували залишок хлороформом. Органічний шар промивали насиченим розчином бікарбонату натрію і сушили над сульфатом натрію, одержуючи бажаний проміжний продукт, вказаний у підзаголовку, у вигляді білої піни (425мг, 100%). MS ES<sup>+</sup> *m/e* 451,1 (M-1).

Д. Одержання 7-(2-морфолін-4-іл-етокси)-4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-хіноліну



2-[4-(2-піридин-2-іл-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл)-хінолін-7-ілокси]-етиловий складний ефір метансульфонові кислоти (87мг, 0,19ммоль) та морфолін (1мл) нагрівали при 50°C протягом 4год. Видаляли морфолін у вакуумі, і екстрагували залишок сумішшю ізопропілового спирту з хлороформом (1:3). Органічний шар промивали розчином хлориду натрію і сушили над сульфатом натрію. Після концентрування у вакуумі одержували бажаний продукт, вказаний у заголовку, у вигляді жовтуватої твердої речовини (83мг, 100%). MS ES<sup>+</sup> *m/e* 442,0 (M+1).

Приклад 2

Одержання 2-(6-метилпіридин-2-іл)-3-(6-амідохінолін-4-іл)-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразолу

А. Одержання 6-бром-4-метилхіноліну

Розчин 4-бромфеніламіну (1екв.) в 1,4-діоксані охолоджували при перемішуванні приблизно до 12°C. Повільно додавали сірчану кислоту (12екв.), і нагрівали суміш до кипіння. До розчину додавали краплями при нагріванні зі зворотним холодильником метилвінілкетон (1,5екв.). Після закінчення додавання нагрівали розчин ще протягом 1 год. Випарювали реакційну суміш досуха і розчиняли в дихлорметані. Доводили рН розчину до 8 за допомогою 1М розчину карбонату натрію і тричі екстрагували водою. Після хроматографування залишку на SiO<sub>2</sub> (елюент суміш гексану з етилацетатом, 70/30) одержували проміжний продукт, вказаний у підзаголовку. MS FS<sup>+</sup> *m/e* 158,2 (M+1).

В. Одержання метилового складного ефіру 6-метилпіридин-2-карбонової кислоти

6-метилпіридин-2-карбонову кислоту (10г, 72,9ммоль) суспендували у дихлорметані (200мл). Охолоджували суміш до 0°C. Додавали метанол (10мл), 4-диметиламінопіридин (11,6г, 94,8ммоль) та гідрохлорид 1-(3-диметикаміно-пропіл)-3-етилкарбодііміду (EDC) (18,2г, 94,8ммоль). Перемішували суміш при кімнатній температурі

протягом 6 год., промивали водою і розсолем і сушили над сульфатом натрію. Суміш фільтрували і концентрували у вакуумі. Після хроматографування залишку на  $\text{SiO}_2$  (елюент 50% етилацетату в і океані) одержували бажаний проміжний продукт, вказаний у підзаголовку (9,66г, 92%) у вигляді безбарвної рідини.

$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,93-7,88 (n, 1H), 7,75-7,7 (m, 1H), 7,35-7,3 (n, 1H), 4,00 (s, 3H), 2,60 (s, 3H).

С. Одержання 2-(6-бромхінолін-4-іл)-1-(6-метилпіридин-2-іл)-етанону

Розчиняли 6-бром-4-метилхінолін (38,5г, 153ммоль) у 600мл безводного ТГФ. Охолоджували до  $-70^\circ\text{C}$  і додавали краплями 0,5М розчин гексаметилдисилазанату калію ( $\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$ , 400мл, 200ммоль) протягом 2 год, підтримуючи температуру нижче  $-65^\circ\text{C}$ . Одержаний розчин перемішували при  $-70^\circ\text{C}$  протягом 1 год., і додавали краплями протягом 15хв. розчин метилового складного ефіру 6-метилпіридин-2-карбонової кислоти (27,2г, 180ммоль) у 100мл безводного ТГФ. У процесі додавання складного ефіру колір суміші змінювався з темно-червоного на горихово-зелений, і утворювався осад. Перемішували суміш при  $-70^\circ\text{C}$  протягом 2 год., після чого давали нагріватися до кімнатної температури при перемішуванні протягом 5 год. Охолоджували суміш, після чого гасили 12-н.  $\text{HCl}$  до  $\text{pH}=1$ . Підвищували  $\text{pH}$  до 9 додаванням твердого карбонату калію. Відділяли розчин декантацією від твердої фази і екстрагували двічі 200мл етилацетату. Об'єднували органічні екстракти, промивали водою і сушили над карбонатом калію. Тверду фазу перемішували у суміші 200мл води та 200мл етилацетату і обробляли додатковою кількістю карбонату калію. Відділяли органічний шар і сушили його разом з вищезгаданими екстрактами в етилацетаті. Концентрували розчин у вакуумі, і одержували темне масло. Пропускали це масло через шар діоксиду кремнію (300мл) із застосуванням дихлорметану, а потім етилацетату. Об'єднували відповідні фракції і концентрували у вакуумі, одержуючи масло бурштинового кольору. Змивали це масло зі стінок колби дихлорметаном, а потім розбавляли гексаном, збовтуючи вміст колби. Одержували 38,5г (73,8%) бажаного проміжного продукту у вигляді жовтої твердої речовини.

$\text{MS ES}^+=341$  ( $\text{M}+1$ ).

Д. Одержання 1-[2-(6-бромхінолін-4-іл)-1-(6-метилпіридин-2-іл)-етиліденаміно]-піролідін-2-ону

Суміш 2-(6-бромхінолін-4-іл)-1-(6-метилпіридин-2-іл)-етанону (38,5г, 113ммоль) та гідрохлориду 1-амінопіролідинону (20г, 147ммоль) у 115мл піридину перемішували при кімнатній температурі протягом 10 год. Додавали приблизно 50г неактивованого молекулярного сита 4А. Продовжували перемішування ще протягом 13 год., додавали 10-15г діоксиду кремнію, і фільтрували суміш через шар діоксиду кремнію (50г). Промивали шар діоксиду кремнію 3л етилацетату. Фільтрати об'єднували і концентрували у вакуумі. Відділяли осад гідразону фільтруванням і відсмоктували досуха, одержуючи

33,3г (69,7%) бажаного проміжного продукту у вигляді злегка забарвленої твердої речовини.

$\text{MS ES}^+=423$  ( $\text{M}+1$ ).

Е. Одержання 6-бром-4-[2-(6-метилпіридин-2-іл)-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл]-хіноліну

До суміші карбонату цезію (1,2екв.) та 1-[2-(6-бромхінолін-4-іл)-1-(6-метилпіридин-2-іл)-етиліденаміно]-піролідін-2-ону (33,3г, 78,7ммоль) додавали 300мл безводного  $\text{N,N}$ -диметилформаміду. Перемішували суміш протягом 20 год. при  $100^\circ\text{C}$ . (У процесі реакції суміш може темніти). Видаляли  $\text{N,N}$ -диметилформамід у вакуумі. Залишок розподіляли між водою та дихлорметаном. Водний шар додатково екстрагували дихлорметаном. Фільтрували органічні фази через шар діоксиду кремнію (300г) з елюванням 1,5л дихлорметану, 1,5л етилацетату і 1,5л ацетону. Відповідні фракції об'єднували і концентрували у вакуумі. Одержаний осад відділяли фільтруванням, і одержували 22,7г (71,2%) бажаного проміжного продукту у вигляді злегка забарвленої твердої речовини.

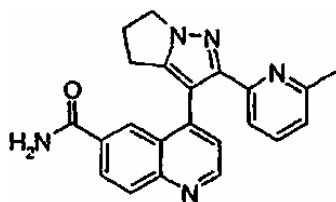
$\text{MS ES}^+=405$  ( $\text{M}+1$ ).

Ф. Одержання метилового складного ефіру 4-[2-(6-метилпіридин-2-іл)-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл]-хінолін-6-карбонової кислоти

До суміші ацетату натрію (19г, 230ммоль) та паладієвого каталізатора - комплексу [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію (II) з дихлорметаном (1:1, 850мл, 1,04ммоль) у 130мл метанолу додавали 6-бром-4-[2-(6-метилпіридин-2-іл)-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл]-хінолін (22,7г, 45ммоль). Створювали над сумішшю атмосферу монооксиду вуглецю під тиском 50фунт/дюйм<sup>2</sup> (345кПа) і перемішували при нагріванні при  $90^\circ\text{C}$  протягом 1 год., безперервно додаючи в реактор монооксид вуглецю. Давали суміші охолоджуватися протягом 8 год., знов створювали у реакторі тиск монооксиду вуглецю і нагрівали при  $90^\circ\text{C}$ . (Тиск може підвищуватися приблизно до 75фунт/дюйм<sup>2</sup> (517кПа). Реакція завершувалася приблизно за 1 год., коли тиск переставав змінюватися, а хроматографія в тонкому шарі (елюент толуол/ацетон, 1:1) посвідчувала відсутність залишкового броміду. Розподіляли суміш між дихлорметаном (600мл) та водою (1л). Водну фазу додатково екстрагували дихлорметаном (400мл). Органічний розчин фільтрували через шар діоксиду кремнію (300мл), і промивали фільтр 500мл дихлорметану, 1200мл етилацетату і 1500мл ацетону. Ацетонову промивну рідину відкидали. Відповідні фракції об'єднували і концентрували, одержуючи 18,8г (87,4%) бажаного проміжного продукту у вигляді рожевого порошку.

$\text{MS ES}^+=385$  ( $\text{M}+1$ ).

Г. Одержання 2-(6-метилпіридин-2-іл)-3-(6-амідохінолін-4-іл)-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразолу



Суміш метилового складного ефіру 4-[2-(6-метилпіридин-2-іл)-5,6-дигідро-4Н-піроло[1,2-*b*]піразол-3-іл]-хінолін-6-карбонової кислоти у 60мл 7-н. розчину аміаку в метанолі нагрівали при 90°C у реакторі з нержавіючої сталі для роботи під тиском протягом 66год. Тиск у реакторі при цьому підвищувався приблизно до 80 фунтів на кв. дюйм (550кПа). Цей тиск підтримували до завершення реакції. Охолоджували реактор, і концентрували коричневу суміш у вакуумі. Твердий залишок очищали, застосовуючи два з'єднаних послідовно картриджі з 12г сорбенту Redi-Pak у кожному, з елюванням ацетоном. Відповідні фракції об'єднували і концентрували у вакуумі. Одержану злегка забарвлену тверду речовину суспендували у дихлорметані, розбавляли гексаном і відфільтровували. Одержували бажаний продукт, вказаний у заголовку, у вигляді злегка забарвленої твердої речовини (1,104г, 63,8%).

MS ES<sup>+</sup>=370 (M+1).

Розкриті в цьому описі сполуки випробовували на інгібування TGF-β за поданими нижче методиками.

Очищення рецептора TGF-β типу I та реакції з кінзами *in vitro*

Для рецепторів TGF-β типу I (RIT204D):

Мічений 6X-HIS домен цитоплазматичної кінрази кожного рецептора експресували і очищали з лізатів клітин Sf9 комах, як коротко описано нижче:

Осаджені клітини через 48-72год. після інфекції лізували у лізісному буфері (LB: 50мМ Трис, pH7,5, 150мМ NaCl, 50мМ NaF, 0,5% NP40 зі свіжододаним 20мМ β-меркаптоетанолом, 10мМ імідазол, 1мМ PMSF, 1X повний інгібітор протеаз без вмісту EDTA, продукт фірми Boehringer-Mannheim).

Лізати клітин просвітлювали центрифугуванням і 0,45мМ фільтрували перед очищенням афінною хроматографією з Ni/NTA (Qiagen).

Хроматографічна методика:

Врівноважували колонку 10 колонковими об'ємами (CV) LB, завантажували пробу, промивали 10 колонковими об'ємами буфері RIPA (50мМ Трис, pH7,5, 150мМ NaCl, 1% NP40, 1мМ EDTA, 0,25% деоксихолату натрію зі свіжододаним 20мМ β-меркаптоетанолом, 1мМ PMSF), промивали 10 CV LB, промивали 10 CV 1X KB (50мМ Трис, pH7,5, 150мМ NaCl, 4мМ MgCl<sub>2</sub>, 1мМ NaF, 2мМ β-меркаптоетанол) і елювали лінійним градієнтом 1KB, який містив 200мМ імідазол.

Обидва ферменти мали ступінь чистоти приблизно 90% і виявляли автофосфорилювальну активність.

Реакційні суміші: 170-200нМ фермент у 1X KB, серія розведень випробовуваної сполуки у 1X KB/16% ДМСО (кінцева концентрація від 20мкМ до

1нМ при кінцевій концентрації ДМСО 4%), реакції ініціювали введенням суміші АТР (кінцева концентрація 4мкМ АТР на 1мк Кі <sup>33</sup>P-γ-АТР) у 1X KB.

Реакційні суміші інкубували при 30°C протягом 1год. Припиняли реакції і кількісно аналізували суміші, застосовуючи стандартне осадження ТСА/BSA на планшети зі скловолоконистими фільтрами Millipore FB та рахування сцинтиляцій на приладі MicroBeta JET із застосуванням рідкого сцинтилятора.

Сполуки, розкриті в цьому описі, інгібують домен кінрази з рецептором TGF-β тину I (RIT204D) зі значеннями IC<sub>50</sub><20мкМ, виявляючи при цьому нижчу токсичність *in vivo* у порівнянні зі структурно аналогічними сполуками, розкритими у вищезгаданій заявці на патент PCT/US02/11884.

До станів, "які характеризуються підвищеною активністю TGF-β", належать стани, при яких стимулюється синтез TGF-β1, отже, TGF-β присутній у підвищених кількостях, або стани, при яких має місце небажана активація латентного протеїну TGF-β або його перетворення в активний TGF-β, або стани, при яких має місце надмірна активація рецепторів TGF-β, або стани, при яких має місце посилене зв'язування протеїну TGF-β з клітинами або з позаклітинною матрицею у місці локалізації захворювання. Таким чином, у будь-якому випадку вираз "підвищена активність" стосується будь-якого стану, при якому біологічна активність TGF-β є небажано високою, незалежно від причини такої активності.

Численні захворювання пов'язані з надмірним продукуванням TGF-β1. Інгібітори внутрішньоклітинного сигнального шляху, до якого включений TGF-β, є корисними засобами лікування фібропроліферативних захворювань. Конкретно, до фібропроліферативних захворювань належать ниркові розлади, пов'язані з нерегульованою активністю TGF-β та надмірним фіброзом, в тому числі гломерулонефрити (GN), наприклад, мезангіальний проліферативний GN, імунного походження та півмісяцевий GN. До інших ниркових розладів належать діабетична нефропатія, інтерстиціальний фіброз нирок, фіброз нирок у пацієнтів після трансплантації, які вживають циклоспорин, та нефропатія, пов'язана з ВІЛ. До колагенових судинних розладів належать прогресивний системний склероз, поліміозит, склеродерма, дерматомиозит, еозинофільний фасцит, кільцеподібна склеродерма та розлади, пов'язані з проявами синдрому Рейно. До фіброзів легенів, що є наслідками надмірної активності TGF-β, належать респіраторний дистрес-синдром дорослих, ідіопатичний фіброз легенів та інтерстиціальний фіброз легенів, часто пов'язаний з аутоімунними розладами, наприклад, системним червоним вовчаком та склеродермою, хімічними подразниками або алергією. Іншим аутоімунним розладом, пов'язаним із фібропроліферативними характеристиками, є ревматоїдний артрит.

До офтальмологічних хворобливих станів, пов'язаних із фібропроліферативним станом, належать хірургічна реплантація сітківки з причин проліферативної вітореїнопатії, операції

видалення катаракти з імплантацією внутрішньоочної лінзи та постглаукома операція відновлення дренажування; усі ці захворювання пов'язані з надмірним продукуванням TGF- $\beta$ 1.

Фіброзні захворювання, пов'язані з надмірним продукуванням TGF- $\beta$ 1, можна підрозділити на хронічні стани, наприклад, фіброз нирок, легенів та печінки, та гострі стани, наприклад, рубцювання шкіри та рестеноз [Чемберлен - Chamberlain J., Cardiovascular Drug Reviews, 19(4):329-344]. Синтез та секреція TGF- $\beta$ 1 пухлинними клітинами можуть також спричинити імуносупресію, що можна спостерігати, наприклад, у пацієнтів з агресивними пухлинами мозку або молочної залози [Arteaga та ін. - Arteaga et al. (1993) J. Clin. Invest. 92:2569-2576]. Перебіг лейшманіозної інфекції у мишей різко змінюється під впливом TGF- $\beta$ 1 [Барраль-Нетто та ін. - Barral-Netto et al., (1992) Science 257: 545-547]. TGF- $\beta$ 1 обтяжує захворювання, тоді як антитіла до TGF- $\beta$ 1 стримують розвиток захворювання у генетично чутливих мишей. Генетично резистентні миші стають чутливими до лейшманіозної інфекції при введенні TGF- $\beta$ 1.

Огляд даних про сильний вплив TGF- $\beta$ 1 на осадження позаклітинної матриці подано в низці публікацій [Рокко та Зіяде - Rocco and Ziyader (1991) in: Contemporary Issues in Nephrology Vol.23, Hormones, autokoids and the kindey, ed. Jay Stein, Churchill Livingston, New York, pp.391-410; Роберт: та ін. - Roberts et al., (1988) Res. Prog. Hormone Res. 44:157-197]; такий вплив включає стимуляцію синтезу та інгібування розкладу компонентів позаклітинної матриці. Оскільки структура та фільтраційні властивості клубочків значною мірою визначаються складом позаклітинної матриці мезангію та клубочкової мембрани, то нема нічого несподіваного у факті, що TGF- $\beta$ 1 чинить сильний вплив на нирки. Нагромадження мезангіальної матриці при проліферативному гломерулонефриті [Бордер та ін. - Border et al., (1990) Kidney Int. 37: 689-695] та при діабетичній нефропатії (Майер та ін. - Mayer et al., (1984) J. Clin. Invest. 74: 1143-1155] є чіткою та домінантною рисою цих захворювань. При діабетичному гломерулосклерозі людини (прогресивній нефропатії) рівень TGF- $\beta$ 1 підвищується [Ямамото та ін. - Yamamoto et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1814-1818]. TGF- $\beta$ 1 є важливим медіатором при генезисі фіброзу нирок у різних тваринних моделях [Фан та ін. - Phan et al., (1990) Kidney Int. 37:426; Окуда та ін. - Okuda et al. (1990) J. Clin. Invest. 86: 453]. Показано, що експериментально індукований гломерулонефрит у пацюків пригнічується під впливом антисироватки проти TGF- $\beta$ 1 [Бордер та ін. - Border et al., (1990) Nature 346:371] та протеїну позаклітинної матриці - декорину, який може зв'язувати TGF- $\beta$ 1 [Бордер та ін., (1992) Nature 360: 361-363].

Надлишок TGF- $\beta$ 1 спричиняє утворення рубцевої тканини шкіри. Показано, що антитіла, які нейтралізують TGF- $\beta$ 1, при вприскуванні пацюкам у краї рани, що загоюється, інгібують рубцювання, не впливаючи на швидкість загоєння рани або міцність рани на розтяг [Шах та ін. - Shah et al.,

(1992) Lancet 339: 213-214]. У той самий час було виявлено послаблений ангиогенез, зменшення кількості макрофагів та моноцитів у рані та зменшену кількість неупорядковано осаджених колагенових волокон у рубцевій тканині.

TGF- $\beta$ 1 може відігравати певну роль у прогресивному потовщенні стінок артерій, яке виникає внаслідок проліферації клітин гладких м'язів та осадження позаклітинної матриці в артеріях після балонної ангіопластики. Діаметр рестенозної артерії внаслідок такого потовщення може зменшитися на 90%, і, оскільки таке зменшення діаметра зумовлюється, головним чином, позаклітинною матрицею, а не клітинами гладких м'язів, то існує можливість розкриття таких судин до 50% тільки шляхом послаблення надлишкового осадження позаклітинної матриці. У непошкоджених артеріях свиней, трансфікованих *in vivo* геном TGF- $\beta$ 1, експресія гена TGF- $\beta$ 1 пов'язувалася як із синтезом позаклітинної матриці, так і з гіперплазією [Нейбл та ін. - Nabel et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10759-10763]. Індукована TGF- $\beta$ 1 гіперплазія була не такою поширеною, як при індукуванні PDGF-BB проте при трансфекції TGF- $\beta$ 1 позаклітинна матриця розросталася сильніше. У цій самій моделі генно-трансфікованих свиней гіперплазія, індукована FGF-1 (секретованою формою FGF), не була пов'язана з осадженням позаклітинної матриці [Нейбл, (1993) Nature 362: 844-846].

Існує кілька типів раку, при яких продукований пухлиною TGF- $\beta$ 1 може виявляти руйнівний вплив. Клітини раку простати пацюків MATLyLu [Штайнер та Баррак - Steiner and Barrack (1992) Mol. Endocrinol. 6: 15-25] та клітини раку молочної залози людини MCF-7 [Arteaga та ін. - Arteaga et al., (1993) Cell Growth and Differ. 4: 193-201] стають більш туморогенними та метастатичними після трансфекції вектором, що експресує TGF- $\beta$ 1 миші. TGF- $\beta$ 1 пов'язаний з ангиогенезом, метастазами та несприятливим прогнозом при раку простати та прогресивному раку шлунка людини [Вікстром та ін. - Wikstrom P. et al., (1998) Prostate 37: 19-29; Саїто та ін. - Saito et al., (1999) Cancer 86: 1455-1462]. При раку молочної залози несприятливий прогноз пов'язаний з підвищеним рівнем TGF- $\beta$  [Діксон та ін. - Dickson et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 837-841; Казид та ін. - Kasid et al., (1987) Cancer Res. 47: 5733-5738; Дейлі та ін. - Daly et al., (1990) J. Cell Biochem. 43: 199-211; Барретт-Лі та ін. - Barrett-Lee et al., (1990) Br. J. Cancer 61: 612-617; Кінг та ін. - King et al., (1989) J. Steroid Biochem. 34: 133-138; Уелч та ін. - Welch et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7678-7682; Уокер та ін. - Walker et al., (1992) Eur. J. Cancer 238: 641-644], і індукція TGF- $\beta$ 1 при лікуванні тамоксифеном [Бутта та ін. - Butta et al., (1992) Cancer Res. 52: 4261-4264] пов'язана з невдачею лікування раку молочної залози тамоксифеном [Тсмпсон та ін. - Thompson et al., (1991) Br. J. Cancer 63: 609-614]. Антитіла проти TGF- $\beta$ 1 інгібують ріст клітин раку молочної залози людини MDA-231 в організмі позбавлених тимусу мишей [Arteaga та ін. - Arteaga et al., (1993) J. Clin. Invest. 92: 2569-2576]; це лікування корелює з

підвищенням активності природних клітин-кілерів селезінки. Клітини СНО, трансфіковані латентним TGF- $\beta$ 1, також спричиняють знижену активність NK та посилений ріст пухлини у голих мишей [Уоллік та ін. - Wallick et al., (1990) J. Exp. Med. 172:1777-1784]. Таким чином, TGF- $\beta$ 1, який секретується пухлинами молочної залози, може спричинити ендокринну імунну пригніченість. Показано, що високі концентрації TGF- $\beta$ 1 у плазмі вказують на несприятливий прогноз для пацієнтів із прогресуючим раком молочної залози [Аншер та ін. - Anischer et al., (1993) N. Engl. J. Med. 328:1592-1598]. У пацієнтів із високим рівнем циркулюючого TGF- $\beta$  перед хіміотерапією високими дозами та автогенною трансплантацією кісткового мозку має місце високий ризик гепатичної венно-оклюзивної хвороби (15-50% усіх пацієнтів із рівнем смертності до 50%) та ідіопатичної інтерстиціальної пневмонії (40-60% усіх пацієнтів). З цих спостережень випливає, що (1) підвищені рівні TGF- $\beta$ 1 у плазмі можна застосовувати для ідентифікації пацієнтів групи ризику і (2) зниження рівня TGF- $\beta$ 1 можна досягти зниження рівня захворюваності та смертності при таких звичайних способах лікування пацієнтів із раком молочної залози.

Багато злоякісних пухлин секретують бета-фактор трансформації росту (TGF- $\beta$ ), який є ефективним імунодепресантом; це наводить на думку, що продукування TGF- $\beta$ 1 може бути важливим механізмом уникнення впливу імунорегуляторної системи організму-хазяїна на пухлину. Встановлення наявності субпопуляції лейкоцитів із перерваним сигнальним шляхом TGF- $\beta$  в організмі, в якому присутня пухлина, вказує на можливий засіб імунотерапії раку. Трансгенна тваринна модель із перерваним сигнальним шляхом TGF- $\beta$  у Т-клітинах здатна ліквідувати нормально летальну лімфому EL4, яка продукує надлишок TGF- $\beta$  [Горелік та Флавел - Gorelik and Flavell (2001) Nature Medicine 7(10): 1118-1122]. Наслідком пригнічення секреції TGF- $\beta$  у клітинах пухлини є відновлення імуногенності організму-хазяїна, тоді як наслідком нечутливості Т-клітин до TGF- $\beta$  є прискорена диференціація та автоімунність, елементи яких можуть бути необхідними для боротьби з пухлинами, що експресують автоантигени в організмі, який набув толерантності. Імунодепресивні ефекти TGF- $\beta$  слід очікувати у субпопуляції хворих на ВІЛ, у яких імунна реакція послаблена у порівнянні з очікуваною на основі підрахованого відношення Т-клітин CD4/CD8 [Гарба та ін. - Garba et al., J. Immunology (2002) 168: 2247-2254]. Антитіло, яке нейтралізує TGF- $\beta$ , здатне змінити на зворотний напрям ефекту у культурі, вказуючи тим самим, що інгібітори сигнального шляху TGF- $\beta$  можуть бути корисними для реверсування імунодепресії, характерної для цієї підгрупи хворих на ВІЛ.

На ранніх стадіях карциногенезу TGF- $\beta$ 1 може діяти як ефективний агент пригнічення пухлини і опосередковувати дію деяких хіміопреventивних агентів. Проте, починаючи з певного моменту розвитку злоякісних новоутворень, клітини пухлини набувають здатності уникати залежного

від TGF- $\beta$  інгібування росту, причому паралельно у мікрооточенні з'являється біоактивний TGF- $\beta$ . Подвійний ефект пригнічення та стимулювання пухлини під впливом TGF- $\beta$  найбільш чітко виявлено у трансгенній системі надлишкового експресування TGF- $\beta$  у кератиноцитах. Трансгенні організми виявляють більшу резистентність до утворення доброякісних пошкоджень шкіри; проте швидкість метастатичного перетворення в таких організмах різко зростає [Кі та ін. - Cui et al., (1996) Cell 84(4): 531-542]. Продукування TGF- $\beta$ 1 злоякісними клітинами у первинних пухлинах, очевидно, зростає на подальших стадіях розвитку пухлини. Дослідження багатьох головних типів епітеліального раку приводить до висновку, що підвищене продукування TGF- $\beta$  раковими пухлинами людей має місце на відносно пізній стадії розвитку пухлини. Крім того, цей TGF- $\beta$  пухлинного походження надає клітинам пухлини селективної переваги та стимулює розвиток пухлини. Вплив TGF- $\beta$  на взаємодію клітин між собою та клітин зі строною забезпечує підвищену здатність до інвазії та утворення метастазів. TGF- $\beta$  пухлинного походження може забезпечити клітинам пухлини уникнення впливу імунорегуляторної системи, оскільки він є ефективним інгібітором клонального поширення активованих лімфоцитів. Показано, що TGF- $\beta$  інгібує також продукування ангіостатину. Терапевтичні способи впливу на рак, наприклад, радіотерапія та хіміотерапія, індукують продукування активованого TGF- $\beta$  у пухлині, тим самим викликаючи селективне розростання злоякісних клітин, резистентних до інгібувальної дії TGF- $\beta$  на ріст. Таким чином, ці способи лікування раку призводять до підвищення ризику та прискорення розвитку пухлин із підвищеною швидкістю росту та здатністю до інвазії. У такій ситуації агенти, спрямовані на порушення опосередкованої TGF- $\beta$  передачі сигналу, можуть забезпечити дуже ефективну терапевтичну стратегію. Показано, що резистентність клітин пухлини до TGF- $\beta$  зводиться нанівець багато цитотоксичних ефектів радіотерапії та хіміотерапії і що активація TGF- $\beta$  у стромі, викликана лікуванням, може бути навіть шкідливою, оскільки внаслідок її мікрооточення пухлини стає більш сприятливим для розвитку пухлини і вносить певний внесок у пошкодження тканини, наслідком якого є фіброз. Тому розроблення інгібіторів передачі сигналу за участю TGF- $\beta$  може само по собі або в комбінації з іншими терапевтичними підходами сприяти лікуванню розвинутого раку.

Сполуки за цим винаходом є корисними для лікування раку та інших хворобливих станів, на які впливає TGF- $\beta$ , шляхом інгібування TGF- $\beta$  у пацієнта, який потребує такого заходу, шляхом введення згаданої сполуки (сполук) в організм пацієнта. TGF- $\beta$  може бути також корисним при лікуванні атеросклерозу [Мак-Каффри - McCaffrey, Cytokine and Growth Factor Reviews 2000, 11, 103-114] та хвороби Альцгеймера [Маслія та ін. - Masliah et al., Neurochemistry International 2001, 39, 393-400].

Фармацевтичні композиції

Композиції за цим винаходом містять терапевтично ефективні кількості вищезазначених антагоністів TGF- $\beta$ . Композиції можна виготовляти із застосуванням звичайних наповнювачів, розріджувачів або носіїв і пресувати в таблетки або виготовляти еліксири чи розчини для звичайного перорального застосування або для введення внутрішньом'язовим або внутрішньовенним шляхом. Згадані сполуки можна застосовувати черезшкірним способом та виготовляти у лікарських формах для модифікованого вивільнення тощо.

Спосіб лікування людини за цим винаходом включає введення в організм пацієнта антагоністів TGF- $\beta$ . Ці антагоністи TGF- $\beta$  входять до складу фармацевтичних композицій, які можна застосовувати пероральним та ректальним шляхами, місцевим способом, парентерально, наприклад, шляхом ін'єкцій та безперервної або періодичної внутрішньоартеріальної інфузії, у формі, наприклад, таблеток, пастилок, під'язичних таблеток, облаток, пакетиків, еліксирів, гелів, суспензій, аерозолів, мазей, які містять, наприклад, від 1% (мас.) до 10% (мас.) активної сполуки у придатній основі, м'яких та твердих желатинових капсул, супозиторіїв, розчинів та суспензій для ін'єкцій у фізіологічно прийнятних середовищах та стерильних фасованих порошків, адсорбованих на матеріалах-основах, для виготовлення ін'єкційних розчинів. Для цієї мети доцільно виготовляти композиції у формах дозованих одиниць, причому перевага віддається дозованим одиницям, кожна з яких містить від приблизно 5мг до приблизно 500мг згаданих сполук (у випадку парентерального або інгаляційного застосування - від приблизно 5мг до 50мг і у випадку перорального або ректального застосування - від приблизно 25мг до 500мг). Застосовувати можна дози активного інгредієнта від приблизно 0,5мг/кг до приблизно 300мг/кг маси тіла на добу (перевагу віддають дозам від 0,5мг/кг до 20мг/кг), проте легко зрозуміти, що конкретну кількість сполуки для вживання має визначити лікар з урахуванням усіх релевантних обставин, в тому числі стану, що підлягає лікуванню, вибору конкретної сполуки для застосування та способу введення, і, отже, вищезазначений діапазон дозування, якому віддають перевагу, жодним чином не обмежує обсяг цього винаходу.

Фармацевтичні композиції, корисні для окремого застосування антагоністів TGF- $\beta$ , як правило, складаються із щонайменше однієї сполуки, вибраної з-посеред сполук, охарактеризованих у цьому описі, змішаної з носієм або розведеної в носії, або вміщеної чи капсульованої у їстівний носій у формі капсули, пакетика-саше, облатки, паперового пакетика або іншого контейнера, або у контейнер одноразового використання, наприклад, в ампулу. Носієм або розріджувачем може бути твердий, напівтвердий або рідкий матеріал, який виконує функцію носія, наповнювача або середовища для терапевтично активної речовини. Необмежувальними прикладами розріджувачів або носіїв, які можна використовувати у складі фармацевтичних

композицій за цим винаходом, є лактоза, декстроза, сахароза, сорбіт, маніт, пропіленгліколь, вазелінове масло, білий м'який парафін, каолін, аерозольний діоксид кремнію, мікрокристалічна целюлоза, силікат кальцію, діоксид кремнію, полівінілпіролідон, цетостеариловий спирт, крохмаль, модифіковані крохмалі, акацієва камедь, фосфат кальцію, масло какао, етоксировані складні ефіри, какаова олія, арахісова олія, альгірати, трагант, желатин, сироп, метилцелюлоза, поліоксіетиленсорбітан-монолаурат, етиллактат, метил- та пропіл-гідроксибензоати, сорбітантриолеат, сорбітансесквіолеат та олеїновий спирт, і пропеленти, наприклад, трихлормонофторметан, дихлордифторметан та дихлортетрафторетан. У випадку виготовлення таблеток до складу композиції може бути введений змащувальний агент для запобігання прихоплюванню та зв'язуванню порошкоподібних інгредієнтів у матрицях та на пуансонах таблетувальної машини. Для цієї мети можна застосовувати, наприклад, стеарати алюмінію, магнію або кальцію, тальк або мінеральне масло.

До фармацевтичних препаратів за цим винаходом, яким віддають перевагу, належать капсули, таблетки, супозиторії, розчини для ін'єкцій, креми та мазі. Особливу перевагу віддають композиціям для інгаляційного застосування, наприклад, аерозольним композиціям, препаратам для ін'єкцій та для перорального застосування.