



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86237

(13) C2

(51) МПК (2009)

C07D 239/90 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

A61P 25/00

A61K 31/517

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

(54) ПОХІДНІ ЗАМІЩЕНОГО 2-АЛКІЛХІАЗОЛІНОНУ ЯК ІНГІБІТОРИ PARP

1

2

(21) a200613304

(22) 28.06.2005

(24) 10.04.2009

(86) PCT/EP2005/053034, 28.06.2005

(31) 04076887.1

(32) 30.06.2004

(33) EP

(46) 10.04.2009, Бюл.№ 7, 2009 р.

(72) ВАН ДЕР АА МАРСЕЛЬ ЙОЗЕФ МАРІЯ,
ВЕ/ВЕ, ВАН ХЕЕРТУМ АЛЬБЕРТУС ХЕНРІКУС
МАРІЯ ТЕРЕЗІЯ, ВЕ/ВЕ, ВАН ДУН ЯКОБУС
АЛЬФОНСУС ЙОЗЕФУС, ВЕ/ВЕ, СОМЕРС МАРІЯ
ВІКТОРІНА ФРАНЦИСКА, ВЕ/ВЕ, ВУТЕРС
ВАЛЬТЕР БУДЕВІЙН ЛЕОПОЛЬД, ВЕ/ВЕ

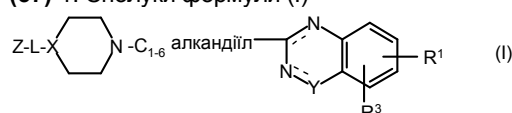
(73) ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА Н.В.

(56) WO 02/48117 A

EP 0 669 919 A

EP 0 885 190 A

(57) 1. Сполуки формули (I)



за умови, коли X являє собою $>\text{CH}-$, $-\text{N}=\text{Y}-$ являє собою $-\text{N}-\text{C}(\text{O})-$, друга пунктирна лінія не є зв'язком, Z являє собою радикал формули (b-2) та L являє собою $-\text{C}(\text{O})-$, тоді C_{1-6} алкандііл- відрізняється від $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

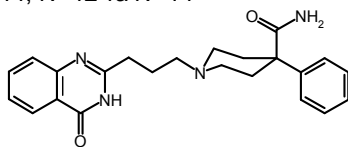
2. Сполука за п.1, яка **відрізняється** тим, що X являє собою $>\text{CH}-$ або $>\text{CR}^2-$, причому R^2 являє собою амінокарбоніл; коли X являє собою $>\text{CR}^2-$, тоді R^2 , узятий разом з $-\text{L}-\text{Z}$, може утворювати бівалентний радикал формули (a-1); R^1 являє собою водень; R^3 являє собою водень; Z являє собою радикал формули (b-1), (b-2) або (b-11); кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню або галогену; L являє собою бівалентний радикал, вибраний з $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ або $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_{1-6}$ алкандіілу; та L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>\text{CR}^2-$ або коли Z являє собою радикал формули (b-11).

3. Сполука за пп.1 або 2, яка **відрізняється** тим, що X являє собою $>\text{CH}-$ або $>\text{CR}^2-$, причому R^2 являє собою амінокарбоніл; R^1 являє собою водень; R^3 являє собою водень; Z являє собою радикал формули (b-1) або (b-2); кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню або галогену; L являє собою бівалентний радикал, вибраний з $-\text{C}(\text{O})-$ або $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, та L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>\text{CR}^2-$.

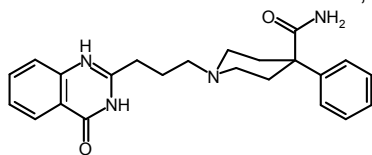
4. Сполука за п.1, яка **відрізняється** тим, що X являє собою $>\text{N}-$, $>\text{CH}-$ або $>\text{CR}^2-$, де R^2 являє собою амінокарбоніл.

5. Сполука за пп.1 або 4, яка **відрізняється** тим, що L являє собою бівалентний радикал, вибраний з $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ або $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_{1-6}$ алкандіілу-, або $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{C}_{1-6}$ алкандіілу-; або L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>\text{CR}^2-$ або, коли Z являє собою радикал формули (b-11).

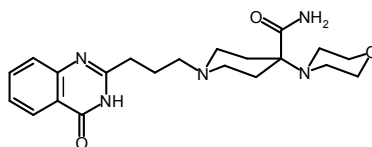
6. Сполука за будь-яким з пп.1-3, яка **відрізняється** тим, що її вибрано із сполук № 4, № 5, № 11, № 12 та № 14



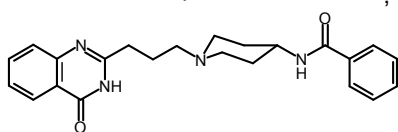
Сполука 4



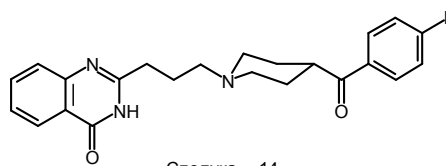
Сполука 5



Сполука 11



Сполука 12



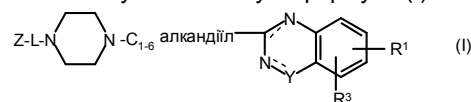
Сполука 14

7. Застосування сполуки, вказаної в будь-якому з пп.1-6, як лікарського засобу.

8. Фармацевтична композиція, що містить фармацевтично прийнятні носії та терапевтично ефективну кількість сполуки, вказаної в будь-якому з пп.1-6, як активний інгредієнт.

9. Спосіб одержання фармацевтичної композиції, вказаної в п.8, який **відрізняється** тим, що фармацевтично прийнятні носії та сполуку, що вказана в будь-якому з пп.1-6, змішують у гомогенну суміш.

10. Застосування сполуки формули (I)



її N-оксидної форми, фармацевтично прийнятних адитивних солей та стереохімічно ізомерних форм, де

пунктирні лінії позначають необов'язкові зв'язки; X являє собою $>\text{N}-$, $>\text{CH}-$ або $>\text{CR}^2-$, де R^2 являє собою амінокарбоніл; або коли X являє собою $>\text{CR}^2-$, тоді R^2 , узятий разом з $-\text{L}-\text{Z}$, може утворювати бівалентний радикал формули

$-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NR}^{10}-$, (a-1)

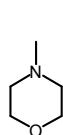
де R^{10} являє собою феніл;

$-\text{N}=\text{Y}-$ являє собою $-\text{N}-\text{C}(\text{O})-$ або $-\text{N}=\text{CR}^4-$, де R^4 являє собою гідроксигрупу;

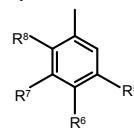
R^1 являє собою водень, галоген, C_{1-6} алкілоксигрупу або C_{1-6} алкіл;

R^3 являє собою водень або C_{1-6} алкілоксигрупу;

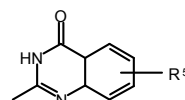
Z являє собою радикал, вибраний з



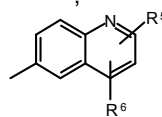
(b-1)



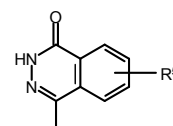
(b-2)



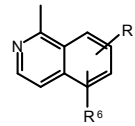
(b-3)



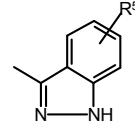
(b-4)



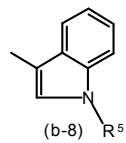
(b-5)



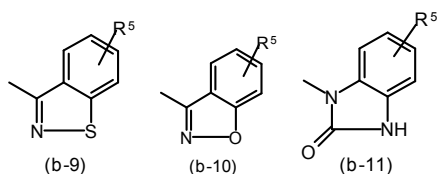
(b-6)



(b-7)



(b-8)



де кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню, галогену, аміногрупи, C_{1-6} алкілу або C_{1-6} алкілоксигрупи; або R^7 та R^8 , узяті разом, можуть утворювати бівалентний радикал формули

$-\text{CH}_2\text{CR}^9_2\text{O}-$, (c-1)

$-(\text{CH}_2)_3\text{O}-$, (c-2)

$-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}-$ (c-3)

або $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$, (c-4)

де кожен R^9 незалежно вибирають із водню або C_{1-6} алкілу; та

L являє собою бівалентний радикал, вибраний з $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ алкандіілу- або $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{C}_{1-6}$ алкандіілу-; або

L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>\text{CR}^2-$ або коли Z являє собою радикал формули (b-11);

для одержання лікарського засобу для лікування опосередкованого PARP захворювання.

11. Застосування за п.10, яке **відрізняється** тим, що PARP-інгібітор формули (I) використовують для виготовлення лікарського засобу для

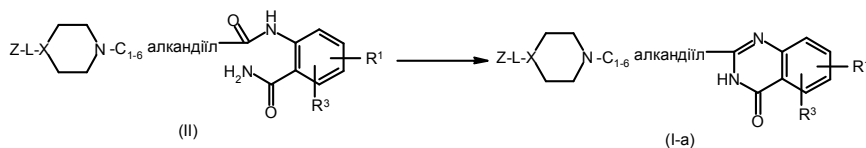
лікування опосередкованого PARP-1 захворювання.

12. Застосування за пп.10 або 11, яке **відрізняється** тим, що лікування включає хемосенсибілізацію.

13. Застосування за пп.10 або 11, яке **відрізняється** тим, що лікування включає радіосенсибілізацію.

14. Комбінація сполуки формули (I) з хіміотерапевтичним агентом, який вибрано з групи, що включає 5-фторурацил, лейковорин, 5'-аміно-5'-дезокситимідин, кисень, карбоген, трансфузії еритроцитів, перфторвуглеводні (наприклад, флюосол 10 DA), 2,3-DPG, BW12C, блокатори кальцієвих каналів, пентоксифілін, антиангіогенні сполуки, гідралазин, LBSO, адриаміцин, камптотецин, карбоплатин, цисплатин, даунорубіцин, доцетаксел, доксорубіцин, інтерферон (альфа, бета, гамма), інтерлейкін-2, іринотекан, паклітаксел, топотекан та терапевтично ефективні аналоги та похідні зазначених вище засобів.

15. Спосіб одержання сполуки, вказаної в п.1, який **відрізняється** тим, що проводять циклізацію придатного заміщеного 2-амінокарбонілбензаміду формули (II) у сполуки формули (I-a), де обидві пунктирні лінії можуть являти собою зв'язок,



Даний винахід відноситься до інгібіторів PARP та представляє сполуки та композиції, що містять описані сполуки. Більш того, даний винахід відноситься до застосування описаних інгібіторів PARP, наприклад, як лікарський засіб.

Даний винахід відноситься до інгібіторів PARP та представляє сполуки та композиції, що містять описані сполуки. Більш того, даний винахід відноситься до застосування описаних інгібіторів PARP, наприклад, як лікарський засіб.

Ядерний фермент полі(АДФ-рибоза)полімераза-1 (PARP-1) є членом сімейства ферментів PARP. Це сімейство ферментів, що збільшується, складається з PARP таких як, наприклад: PARP-1 PARP-2, PARP-3 та Vault-PARP; та танкираз (TANK), таких як, наприклад: TANK-1, TANK-2 та TANK-3. PARP також називають полі(аденозин-5'-дифосфорибоза)полімеразою або PARS (полі(АДФ-рибоза)синтетазою).

PARP-1 є основним ядерним білком з масою 116кДа, що складається із трьох доменів: N-кінцевого Днк-єднального домену, що містить два цинкових пальці, домен аутомодифікації та C-кінцевої каталітичний домен. Він представлений практично у всіх еукаріот. Фермент здійснює синтез полі(АДФ-рибози), розгалуженого полімеру, що

складається з більш ніж 200 залишків АДФ-рибози. Білкові акцептори полі(АДФ-рибози) безпосередньо або побічно залучені в підтримку цілісності ДНК. Вони включають гистони, топоізомерази, ДНК та РНК полімерази, ДНК-лігази та Ca^{2+} - та Mg^{2+} -залежні ендонуклеази. Білок PARP експресується на високому рівні в багатьох тканинах, особливо в клітинах імунної системи, серця, головного мозку та у клітинах зародкової лінії. У нормальних фізіологічних умовах активність PARP мінімальна. Однак ушкодження ДНК приводить до негайного підвищення активності PARP більш ніж у 500 разів.

Танкирази (TANK) були ідентифіковані як компоненти тіломерного комплексу людини. Також передбачалося, що вони беруть участь у везикулярному транспорті та можуть служити як каркас для білків, залучених у безлічі інших клітинних процесів. Тіломери, які необхідні для підтримки цілісності та стабільності хромосом, підтримуються за допомогою тіломерази, спеціалізованої зворотної транскриптази. TANK являють собою (АДФ-рибоза)трангранулазу з деякими властивостями як сигнальних білків, так й білків цитоскелету. Вони містять домен PARP, що каталізує поліадф-рибозилування субстратних білків, альфа-мотив стерильності, що належить певним сигнальним

молекулам, та домен ANK, що містить 24 анкіринових повторів, гомологічних білку цитоскелета анкірину. Домен ANK взаємодіє з тіломерним білком, що зв'язує тіломерні повтори фактором-1 (TRF-1). Таким чином, зазначені білки називають взаємодіючими з TRF1, анкірин-з'вязаними полімерами Адф-рибози (TANK).

Однієї з більш конкретних функцій TANK є Адф-рибозилування в TRF-1. Для здійснення функції тіломер у людини необхідно два специфічних для тіломер Днк-еднального білка, TRF-1 та TRF-2. TRF-2 захищає кінці хромосом, та TRF-1 регулює довжину тіломери. Рибозилування Адф приводить до інгібування здатності TRF-1 зв'язуватися з тіломерною ДНК. Це рибозилування полі-адф в TRF-1 приводить до від'єднання TRF-1 від тіломер, відкриваючи тіломерний комплекс та створюючи можливість доступу для тіломерази. Таким чином, TANK функціонує як позитивний регулятор довжини тіломери, створюючи можливість для елонгації тіломер тіломеразою.

Серед безлічі функцій, які приписують PARP та особливо PARP-1, його головна роль складається в полегшенні репарації ДНК за допомогою рибозилування Адф та, таким чином, координування ряду білків репарації ДНК. У результаті активації PARP, рівні NAD^+ значно знижуються. Надмірна активація PARP приводить до важкого виснаження запасів NAD^+ у клітинах, у яких відбулося велике ушкодження ДНК. Короткий час напіврозпаду полі(Адф-рибози) приводить до великої швидкості кругообігу. Після утворення полі(Адф-рибози), вона швидко деградується конститутивно активною полі(Адф-рибоза)глікогідролазою (PARG) разом з фосфодіестеразою та (Адф-рибоза)ліазою білка. PARP та PARG утворюють цикл, що перетворює велику кількість NAD^+ в Адф-рибозу. Менш ніж за одну годину надлишкова стимуляція PARP може привести до падіння рівня NAD^+ та АТФ до менш ніж 20% від нормального рівня. Такий сценарій є особливо небезпечним при ішемії, коли недолік кисню вже істотно порушив вироблення енергії. Наступна продукція вільних радикалів у процесі реперфузії, як думають, є основною причиною ушкодження в тканинах. Частково зниження рівня АТФ, що є типовим для безлічі органів у процесі ішемії та реперфузії, може бути пов'язане з виснаженням NAD^+ внаслідок кругообігу полі(Адф-рибози). Таким чином, очікується, що інгібування PARP або PARG буде зберігати рівень енергії клітини, тим самим, збільшуючи виживаність ішемізованих тканин після ушкодження.

Синтез полі(Адф-рибози) також залучений до індукцію експресії ряду генів, необхідних для запального відклику. Інгібітори PARP придушують продукцію індукційно синтезу оксиду азоту (iNOS) у макрофагах, селектина Р-типу та молекули міжклітинної адгезії-1 (ICAM-1) в ендотеліальних клітинах. Така активність лежить в основі сильних протизапальних ефектів, які проявляються інгібіторами PARP. Інгібування PARP може привести до зменшення некрозу за допомогою запобігання транспорту та інфільтрації нейтрофілів в ушкоджені тканини.

PARP активується ушкодженими фрагментами ДНК та після активації каталізує приєднання аж до 100 залишків Адф-рибози до безлічі ядерних білків, включаючи гістони та саму PARP. При значних стресових впливах на клітини надмірна активація PARP може швидко привести до ушкодження та загибелі клітин внаслідок виснаження запасів енергії. Тому що на відновлення кожної молекули NAD^+ витрачається чотири молекули АТФ, та масова активація PARP приводить до виснаження запасів NAD^+ , то при спробах ресинтезувати NAD^+ , запаси АТФ також виснажуються.

Повідомлялося, що активація PARP відіграє ключову роль у нейротоксичності, яка індукується як NMDA, так й NO. Це було показано на кортикальній культурі та на зрізах гіпокампу, де запобігання токсичності прямо корелює зі здатністю інгібувати PARP. Можлива роль інгібіторів PARP для лікування нейродегенеративних захворювань та травми голови, таким чином, була встановлена навіть при відсутності пояснення їхнього механізму дії.

Аналогічно було показано, що разові ін'єкції інгібіторів PARP приводили до зниження розміру області інфаркту внаслідок ішемії та реперфузії у серці або в кістяковому м'язі у кроликів. У цих дослідженнях однократна ін'єкція 3-амінобензаміду (10мг/кг) або за одну хвилину до оклюзії, або за одну хвилину до реперфузії, приводила до подібного зниження розміру області інфаркту у серці (32-42%), а 1,5-дигідроксиізохінолін (1мг/кг), ще один інгібітор PARP, викликав зниження розміру області інфаркту на порівнянному рівні (38-48%). Ці результати роблять доцільним припущення про те, що інгібітори PARP можуть відновлювати попередньо ішемізоване серце або кістякову м'язову тканину після реперфузійного ушкодження.

Активацию PARP також можна використовувати як показник ушкодження після нейротоксичних ушкоджень внаслідок впливу кожного з наведених нижче індукторів, таких як глутамат (через стимуляцію рецепторів NMDA), реакційно-здатні проміжні сполуки кисню, β -амілоїдний білок, N-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин (MPTP) або його активний метаболіт N-метил-4-фенілпіридин (MPP⁺), що бере участь у розвитку патологічних станів, таких як інсульт, хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона. В інших дослідженнях було продовжене дослідження ролі активації PARP на зернистих клітинах мозочка *in vitro* та у нейротоксичності з MPTP. Надмірний вплив на нейрони глутамату, що виконує роль переважного нейротрансмітера центральної нервової системи та діє через рецептори N-метил-D-аспартату (NMDA) та інші підтипи рецепторів, часто відбувається як результат інсульту або іншого нейро дегенеративного процесу. Позбавлені кисню нейрони в більших кількостях вивільняють глутамат у процесі ішемічного ушкодження головного мозку, такого як інсульт, або після інфаркту міокарда. Це надлишкове вивільнення глутамату у свою чергу викликає надлишкову стимуляцію (ексайтотоксичність) рецепторів N-метил-D-аспартату (NMDA), AMPA, Kainate та MGR, що приводить до відкриття іонних каналів та забезпечує неконтрольований потік

іонів (наприклад, Ca^{2+} й Na^+ у клітини та K^+ із клітин), що приводить до надмірної стимуляції нейронів. Нейрони при надмірній стимуляції секретують більшу кількість глутамату, створюючи ланцюг зі зворотним зв'язком або ефект "доміно", що, в остаточному підсумку, приводить до ушкодження клітини або смерті внаслідок продукції протеаз, ліпаз та вільних радикалів. Надмірна активація рецепторів глутамату залучена в різні неврологічні захворювання та стани, включаючи епілепсію, інсульт, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, бічний аміотрофічний склероз (ALS), хворобу Гентінгтона, шизофренію, хронічний біль, ішемію та втрату нейронів після гіпоксії, гіпоглікемії, ішемії, травми та ушкодження нерва. Вплив глутамату та стимуляція глутаматом також беруть участь у якості основи в компульсивних порушеннях, зокрема, залежно від лікарських засобів. Доказу того, що антагоністи рецепторів глутамату (тобто, сполуки, які блокують зв'язування глутамату або активацію глутаматом його рецепторів) блокують ушкодження нейронів після судинного інсульту, включають результати досліджень на тваринах багатьох видів, а також на церебральній кортикальній культурі, обробленій глутаматом або NMDA. При спробах запобігти ексайтотоксичності блокуванням рецепторів NMDA, AMPA, Kainate та MGR зіштовхнулися зі складностями внаслідок того, що кожний рецептор має безліч ділянок, з якими може зв'язуватися глутамат та, таким чином, пошук ефективного сполучення антагоністів або універсального антагоніста для запобігання зв'язування глутамату з усіма рецепторами та для того, щоб отримати можливість дослідження цієї теорії, є утрудненим. Більш того, безліч композицій, які є ефективними відносно блокування рецепторів, також є токсичними для тварин. Власне кажучи, у цей час не існує відомого ефективного способу лікування аномалій, пов'язаних із глутаматом.

Стимуляція глутаматом рецепторів NMDA, наприклад, приводить до активації ферменту, нейрональної синтетази оксиду азоту (nNOS), що приводить до утворення оксиду азоту (NO), що також бере участь у нейротоксичності. Нейротоксичності, пов'язаної з NMDA, можна запобігти введенням інгібіторів синтетази оксиду азоту (NOS) або за допомогою спрямованого генетичного ушкодження nNOS *in vitro*.

Інше використання інгібіторів PARP являє собою лікування ушкоджень периферичних нервів та синдрому, що є їхнім наслідком, патологічного болю, відомого як невропатичний біль, такого як біль, викликаний ушкодженням внаслідок тривалого здавлювання (CCI) загального сідничного нерва та при якому відбувається транссинаптична зміна дорзального рогу спинного мозку, що характеризується гіперхроматозом цитоплазми та нуклеоплазми (так називані "темні" нейрони).

Також існують докази того, що інгібітори PARP корисні для лікування запальних порушень кишечника, таких як коліти. Конкретно, коліти викликали в пацієнтів за допомогою введення в просвіт гаптену тринітробензолсульфонової кислоти в 50% етанолі. Після введення пацієнтам вводили 3-амінобензамід, специфічний інгібітор активності

PARP. Інгібування активності PARP приводило до зниження запальної відповіді та відновленню морфології та активності дистального кишечника.

Крім того, докази дозволяють припустити, що інгібітори PARP корисні для лікування артритів. Крім того, інгібітори PARP, очевидно, корисні для лікування діабету. Було показано, що інгібітори PARP корисні для лікування ендотоксичного шоку або септичного шоку.

Інгібітори PARP також використовуються для збільшення строку життя та проліферативної здатності клітин, включаючи лікування захворювань, таких як старіння шкіри, хвороба Альцгеймера, атеросклероз, остеоартрит, остеопороз, м'язова дистрофія, дегенеративні захворювання кістякової мускулатури, що включають реплікативні вікові зміни, пов'язану з віком м'язову дегенерацію, вікові зміни імунної системи, СНІД та інші захворювання імунної системи, зв'язані зі старінням; та для зміни експресії генів у старіючих клітинах.

Також відомо, що інгібітори PARP, такі як 3-амінобензамід, діють на репарацію ДНК у цілому, наприклад, у відповідь на вплив пероксиду водню або іонізуючої радіації.

Ключова роль PARP у репарації розривів ланцюгів ДНК твердо встановлена, особливо, при репарації, викликаній безпосередньо іонізуючою радіацією або побічно після ферментативної репарації ушкоджень ДНК, викликаних метилуючими агентами, інгібіторами топоізомерази та іншими хемотерапевтичними засобами, такими як числатин та блеоміцин. Безліч досліджень із використанням "нокауту" мишей, моделей із трансдомінантним інгібуванням (сверхекспресія ДНК-єднального домену), антизначенєвих та низькомолекулярних інгібіторів показало роль PARP у репарації та виживанні клітин після індукції ушкодження ДНК. Інгібування ферментативної активності PARP повинне привести до посилення чутливості клітин пухлини до способів лікування з ушкодженням ДНК.

Повідомлялося, що інгібітори PARP ефективні в радіосенсибілізації (гіпоксичних) клітин пухлини та ефективні в запобіганні відновлення клітин пухлини при потенційно летальному та сублетальному ушкодженні ДНК після променевої терапії, очевидно, внаслідок їхньої здатності запобігати возз'єднанню розривів ДНК та внаслідок їхнього впливу на ряд сигнальних шляхів, зв'язаних з ушкодженням ДНК.

Інгібітори PARP використовуються для лікування злоякісної пухлини. Крім того, у [патенті США No.5177075] описані невелика кількість ізохіолінів, які використовуються для посилення летальних ефектів іонізуючої радіації або хемотерапевтичних засобів на клітини злоякісної пухлини. [Weltin et al. в "Effect of 6(5-Phenanthridinone), an Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase, on Cultured Tumor Cells", *Oncol. Res.*, 6: 9, 399-403 (1994)], описують інгібування активності PARP, зниження проліферації пухлинних клітин та виражений синергічний ефект при додатковому введенні в пухлинні клітини алкілюючого лікарського засобу.

Огляди рівня техніки опубліковані [Li та Zhang в IDrugs 2001, 4(7): 804-812, Ame et al. в Bioassays 2004, 26: 882-883 та Nguewa et al. в Progress in Biophysic & Molecular Biology 2005, 88: 143-172].

Зберігається потреба в ефективних та потужних інгібіторах PARP та, більш конкретно, інгібіторах PARP-1, які викликають мінімальні побічні дії. Даний винахід відноситься до сполук, композицій для інгібування активності PARP та способів інгібування активності PARP для лікування злоякісної пухлини та/або профілактики ушкодження клітин, тканин та/або органа або загибелі внаслідок, наприклад, некрозу або апоптозу. Сполука та композиції за даним винаходом корисні, особливо, для посилення ефективності хемотерапії та променевої терапії, де основний ефект лікування являє собою ефект внаслідок ушкодження ДНК у клітинах-мішенях.

[Патент GB 1062357, опублікований 22 березня 1967 року], розкриває похідні хіназолону, що мають антигіпертензивні дії.

[Патент DE 2258561, опублікований 20 червня 1973 року], розкриває похідні заміщеного піридину з антигіпертензивною дією.

[Патент EP 13612, опублікований 11 листопада 1983 року], розкриває похідні заміщеного піперидиніалкілхіназоліну. Описані сполуки являють собою антагоністи серотоніну. Більш конкретно, розкриває сполука №63 даного винаходу.

[Патент EP 669919, опублікований 9 червня 1994 року], розкриває диметилбензофурані та диметилбензопірани в якості 5-HT₃ антагоністів.

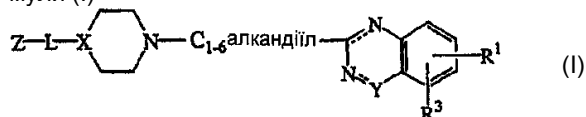
[Патент US 5374637, опублікований 20 грудня 1994 року], розкриває похідні бензаміду. Розкриті сполуки мають властивості стимулювати скорочувальну здатність шлунково-кишкового тракту.

[Патент EP 885190, опублікований 23 грудня 1998 року], розкриває похідні 1,4-дизаміщеного піперидину, що мають гастрокінетичні властивості.

[Патент EP 1036073, опублікований 17 червня 1999 року], розкриває похідні заміщеного хіназоліндіону. Описані сполуки мають властивості фундаментальної релаксації.

[Патент EP 1355888, опублікований 20 червня 2002 року], розкриває похідні хіназолінону як інгібітори PARP.

Даний винахід відноситься до сполук формули (I)

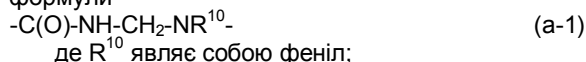


їхніх N-оксидних форм, фармацевтично прийнятних адитивних солей та стереохімічно ізомерних форм, де

пунктирні лінії позначають необов'язкові зв'язки;

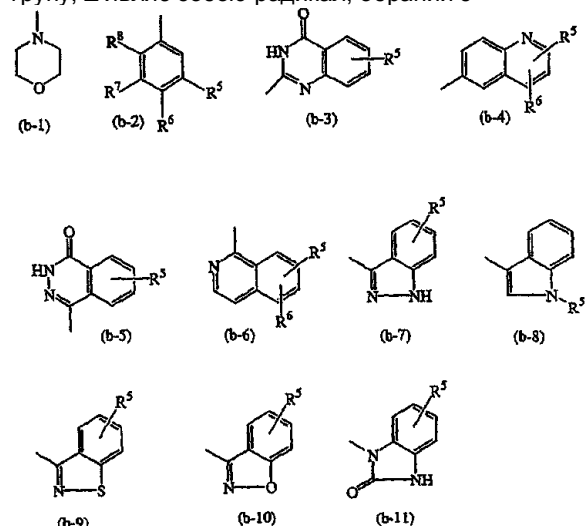
X являє собою >N-, >CH- або >CR²-, де R² являє собою амінокарбоніл; або

коли X являє собою >CR²-, тоді R², узятий разом з -L-Z, може утворювати бівалентний радикал формули

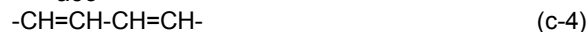
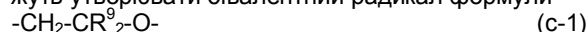


де R¹⁰ являє собою феніл;

—N—Y— являє собою -N-C(O)- або -N=CR⁴-, де R⁴ являє собою гідрокси групу; R¹ являє собою водень, галоген, C₁₋₆алкілокси групу або C₁₋₆алкіл; R³ являє собою водень або C₁₋₆алкілокси групу; Z являє собою радикал, обраний з



де кожен R⁵, R⁶, R⁷ та R⁸ незалежно вибирають із водню, галогену, аміно групи, C₁₋₆алкілу або C₁₋₆алкілокси групи; або R⁷ та R⁸, узяті разом, можуть утворювати бівалентний радикал формули



де кожен R⁹ незалежно вибирають із водню або C₁₋₆алкілу; та L являє собою бівалентний радикал, обраний з -C(O)-, -C(O)-NH-, -C(O)-C₁₋₆алкандііл- або -C(O)-O-C₁₋₆алкандііл-; або

L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою >CR²- або коли Z являє собою радикал формули (b-11);

за умови, коли X являє собою >CH-,

—N—Y— являє собою -N-C(O)-, друга пунктирна лінія не є зв'язком, Z являє собою радикал формули (b-2) та L являє собою -C(O)-, тоді C₁₋₆алкандііл- відрізняється від -CH₂-CH₂-.

Сполуки формули (I) можуть також існувати у вигляді своїх таутомерних форм. Мається на увазі, що такі форми, хоча й не зображені безпосередньо у вищенаведеній формулі, охоплюються рамками даного винаходу.

Ряд термінів, які використовуються у попередніх визначеннях та далі по тексту, пояснені у цьому опису нижче. Ці терміни іноді використовуються самі по собі або в складних термінах.

У тому розумінні, у якому він використаний у попередніх визначеннях та далі по тексту, галоген являє собою родовий термін для фтору, хлору, броду та йоду; C₁₋₆алкіл позначає насичені вуглеводневі радикали з лінійним та розгалуженим ланцюгом, що мають від 1 до 6 атомів вуглецю, такі як, наприклад, метил, етил, пропіл, бутил, пентил, гексил, 1-метилетил, 2-метилпропіл, 2-метилбутил, 2-метилпентил тощо; C₁₋₆алкандііл позначає бівалентні насичені вуглеводневі ради-

кали з лінійним та розгалуженим ланцюгом, що мають від 1 до 6 атомів вуглецю, такі як, наприклад, метилен, 1,2-етандііл, 1,3-пропандііл, 1,4-бутандііл, 1,5-пентандііл, 1,6-гександііл та їхні розгалужені ізомери, такі як 2-метилпентандііл, 3-метилпентандііл, 2,2-диметилбутандііл, 2,3-диметилбутандііл тощо.

Під терміном "фармацевтично прийнятні солі" маються на увазі фармацевтично прийнятні кислоти або основні адитивні солі. Мають на увазі, що фармацевтично прийнятні солі або основні адитивні солі, вищезгадані тут, включають терапевтично активні нетоксичні кислоти та нетоксичні основні адитивні сольові форми, які здатні утворювати сполуки формули (I). Сполуки формули (I), які мають основні властивості можна перетворити в їх фармацевтично прийнятні кислоти адитивні солі за допомогою обробки зазначеної основної форми придатною кислотою. Придатні кислоти включають, наприклад, неорганічні кислоти, такі як галогеноводневі кислоти, наприклад, соляну або бромоводневу кислоту; сірчану кислоту; азотну кислоту; фосфорну кислоту та інші подібні їм кислоти; або органічні кислоти, такі як, наприклад, оцтову кислоту, пропанову кислоту, гідроксиоцтову кислоту, молочну кислоту, пірвіноградну кислоту, щавлеву кислоту, малонову кислоту, бурштинову кислоту (тобто бутандіонову кислоту), малеїнову кислоту, фумарову кислоту, яблучну кислоту, винну кислоту, лимонну кислоту, метансульфонову кислоту, етансульфонову кислоту, бензолсульфонову кислоту, п-толуолсульфонову кислоту, цикламову кислоту, саліцилову кислоту, п-аміносаліцилову кислоту, памову кислоту та інші подібні їм кислоти. Сполуки формули (1), які мають кислотні властивості, можна перетворити в їх фармацевтично прийнятні основні адитивні солі за допомогою обробки зазначеної кислотної форми придатною органічною або неорганічною основою. Придатні основні сольові форми включають, наприклад, амонійні солі, солі лужних та лужноземельних металів, наприклад, літєві солі, натрієві солі, калієві, магнієві солі, кальцієві солі тощо, солі з органічними основами, наприклад, бензатинові солі, N-метил-D-глюкамінові солі, гідрабамінові солі та солі з амінокислотами, такими як, наприклад, аргінін, лізін тощо. Терміни кислоти або основні адитивні солі також включають гідрати та форми з адитивним розчинником, які здатні утворювати сполуки формули (I). Прикладами таких форм є, наприклад, гідрати, алкоголяти тощо.

Термін "стереохімічно ізомерні форми сполук формули (I)", який використовується в даному описі, відноситься до всіх можливих сполук, що складаються із тих самих атомів, зв'язаних однієї й тією же послідовністю зв'язків, але із тривимірними структурами, що відрізняються, що не є рівнозначними, які сполуки формули (I) можуть мати. Якщо не згадано або не зазначене інше, хімічне позначення сполуки включає суміш всіх можливих стереохімічних ізомерних форм, які зазначена сполука може мати. Зазначена суміш може містити всі діастереомери та/або енантіомери базової молекулярної структури зазначеної сполуки. Мається на увазі, що всі стереохімічно ізомерні форми спо-

лук формули (I) як у чистій формі, так й у суміші одна з іншою, входять до обсягу даного винаходу.

Під формами N-оксидів сполук формули (I) маються на увазі, що вони включають сполуки формули (I), де один або кілька атомів азоту окислені до так званих N-оксидів, зокрема, до N-оксидів, у яких один або кілька атомів азоту піперидину або піперазину N-окисдовані.

Під терміном "сполука формули (I)", який використовується у даному описі, маються на увазі, що він також включає форми N-оксидів, фармацевтично прийнятні кислотні або основні адитивні солі та всі стереоізомерні форми.

[Патент GB 1062357] розкриває похідні хіназолону, що мають антигіпертензивні дії. [Патент DE 2258561] розкриває похідні заміщеного піридинону з антигіпертензивною дією. [Патент EP 13612] розкриває похідні заміщеного піперидинілакілхіназоліну, які являють собою антагоністи серотоніну. [Патент EP 669919] розкриває диметилбензофурані та диметилбензопірані в якості 5-HT₃ антагоністів. [Патент US 5374637] розкриває похідні бензаміду, які мають властивості стимулювати скорочувальну здатність шлунково-кишкового тракту. [Патент EP 885190] розкриває похідні 1,4-дізаміщеного піперидину, що мають гастрокінетичні властивості. [Патент EP 1036073] розкриває похідні заміщеного хіназоліндіону, які мають властивості фундаментальної релаксації. [Патент EP 1355888] розкриває похідні хіназолінону як інгібітори PARP.

Знаєцька було знайдено, що сполуки за даним винаходом виявляють PARP-інгібіручу активність.

Перша група сполук, які представляють інтерес, складається з тих сполук формули (I), де діє одне або більша кількість наступних обмежень:

a) X являє собою >N- або >CR²-, де R² являє собою амінокарбоніл;

b) коли X являє собою >CR²-, тоді R², узятий разом з -L-Z, може утворювати бівалентний радикал формули (a-1);

c) $\text{---}\overset{\text{N}}{\text{---}}\text{---}\overset{\text{Y}}{\text{---}}$ являє собою -N-C(O)- або -N=CR⁴-, де R⁴ являє собою гідрокси групу, а друга пунктирна лінія являє собою зв'язок;

d) R¹ являє собою галоген, C₁₋₆алкілокси групу або C₁₋₆алкіл;

e) R³ являє собою C₁₋₆алкілокси групу;

f) Z являє собою радикал, обраний з (b-1), (b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7), (b-8), (b-9), (b-11), (b-11);

g) кожен R⁵, R⁶, R⁷ та R⁸ незалежно вибирають із водню, аміно групи, C₁₋₆алкілу або C₁₋₆алкілокси групи;

h) L являє собою бівалентний радикал, обраний з -C(O)-NH-, -C(O)- C₁₋₆алкандіілу-або -C(O)-O-C₁₋₆алкандіілу-.

Друга група сполук, які представляють інтерес, складається з тих сполук формули (I), де діє одне або більша кількість наступних обмежень:

a) X являє собою >CH- або >CR²-, де R² являє собою амінокарбоніл;

b) коли X являє собою >CR²-, тоді R², узятий разом з -L-Z, може утворювати бівалентний радикал формули (a-1);

c) R¹ являє собою водень;

- d) R^3 являє собою водень;
 е) Z являє собою радикал формули (b-1), (b-2) або (b-11);
 ф) кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню або галогену;
 д) L являє собою бівалентний радикал, обраний з -C(O)-, -C(O)-NH- або -C(O)- C_{1-6} алканділу-; та

h) L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>CR^2$ - або, коли Z являє собою радикал формули (b-11).

Третя група сполук, які представляють інтерес, складається з тих сполук формули (I), де діє одне або більша кількість наступних обмежень:

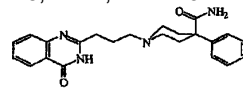
- а) X являє собою $>CH$ - або $>CR^2$ -, де R^2 являє собою амінокарбоніл;
 б) R^1 являє собою водень;
 в) R^3 являє собою водень;
 д) Z являє собою радикал формули (b-1) або (b-2);
 е) кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню або галогену;
 ф) L являє собою бівалентний радикал, обраний з -C(O)- або -C(O)-NH-; та
 г) L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>CR^2$ -.

Група кращих сполук складається з тих сполук формули (I), де X являє собою $>CH$ - або $>CR^2$ -, причому R^2 являє собою амінокарбоніл; коли X являє собою $>CR^2$ -, тоді R^2 , узятий разом з -L-Z, може утворювати бівалентний радикал формули (a-1); R^1 являє собою водень; R^3 являє собою водень; Z являє собою радикал формули (b-1), (b-2) або (b-11); кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню або галогену; L являє собою бівалентний радикал, обраний з -C(O)-, -C(O)-NH- або -C(O)- C_{1-6} алканділу-; та L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>CR^2$ - або коли Z являє собою радикал формули (b-11).

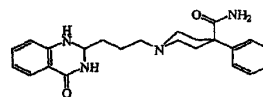
Група кращих сполук складається з тих сполук формули (I), де X являє собою $>CH$ - або $>CR^2$ -, причому R^2 являє собою амінокарбоніл; R^1 являє

собою водень; R^3 являє собою водень; Z являє собою радикал формули (b-1) або (b-2); кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню або галогену; L являє собою бівалентний радикал, обраний з -C(O)- або -C(O)-NH- та L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>CR^2$ -.

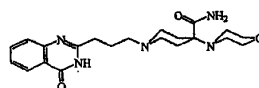
Найбільш кращими сполуками є сполуки №4, №5, №11, №12 та №14.



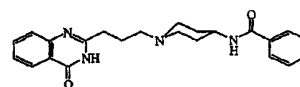
Сполука 4



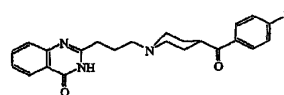
Сполука 5



Сполука 11



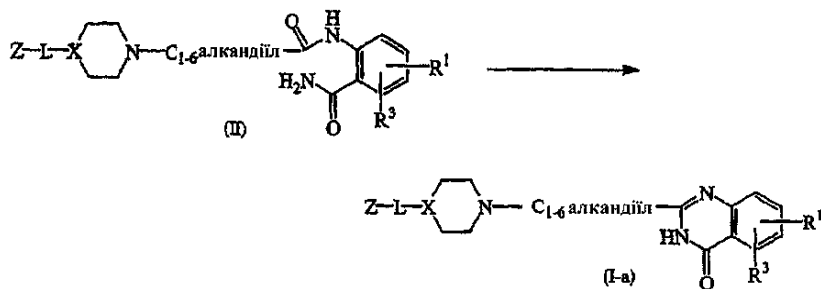
Сполука 12



Сполука 14

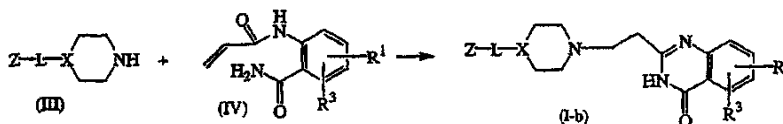
Сполуки формули (I) можуть бути отримані у відповідності зі способами, що носять загальний характер, описаними в [EP 13612]. Вихідні речовини та деякі з похідних являють собою відомі сполуки та є комерційно доступними або можуть бути отримані відповідно до загальноприйнятих способів проведення реакцій, що є широко відомими у даній галузі. Деякі способи одержання будуть описані у цьому опису далі більш докладно. Інші способи одержання цільових сполук формули (I) описані в прикладах.

Сполуки формули (I), де ---N---Y--- являє собою -N-C(O)-, а друга пунктирна лінія являє собою зв'язок, які названі у цьому опису сполуками формули (1-a), можуть бути отримані з придатних заміщених 2-амінокарбонілбензамідів формули (II) за допомогою циклізації останніх, застосовуючи відомі у даній галузі способи циклізації.

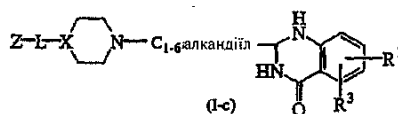
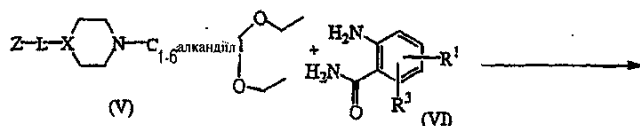


Альтернативно, сполуки формули (I), де - C_{1-6} алканділ- являє собою -CH₂-CH₂- та ---N---Y--- являє собою -N-C(O)-, а друга пунктирна лінія є зв'язком, які названі у цьому опису сполуками формули (I-b), можуть бути отримані

за допомогою циклізації проміжної сполуки формули (III) з придатного заміщеного 2-амінокарбонілбензаміду формули (IV), використовуючи відомі у даній галузі способи циклізації.



Сполуки формули (I), де ---N---Y--- являє собою -N-C(O)- , а друга пунктирна лінія не є зв'язком, які названі у цьому опису сполуками формули (I-с), можуть бути отримані з придатного заміщеного 2-амінобензаміду формули (V) шляхом циклізації останнього з придатної заміщеної проміжної сполуки формули (VI). Зазначена реакція циклізації може бути легко здійснена спільним пе-



Сполуки формули (I) також можуть бути перетворені одна в одну за допомогою відомих в даній галузі реакцій або трансформацій функціональних груп. Деякі з таких трансформацій уже описані вище. Інші приклади являє собою гідроліз складних ефірів карбонових кислот до відповідних карбонових кислот або спиртів; гідроліз амідів до відповідних карбонових кислот або амінів; гідроліз нітрilів до відповідних амідів; аміногрупи імідазолу або фенілу можуть бути замінені воднем відомими в даній галузі реакціями діазотування та наступною заміною діазогруп воднем; спирти можуть бути перетворені в складні та прості ефіри; первинні аміни можуть бути перетворені у вторинні або третинні аміни; подвійні зв'язки можуть бути гідрогеновані до відповідного одинарної зв'язку; радикал йоду на фенільній групі може бути перетворений у складноефірну групу вставкою монооксиду вуглецю в присутності придатного паладієвого каталізатора.

Даний винахід також відноситься до сполук формули (I), як визначено вище, для застосування як лікарський засіб.

Як можна бачити з експериментальної частини, яку наведено нижче, сполуки за даним винаходом мають властивості інгібування PARP.

Термін "PARP" використовується в даному описі для позначення білка з активністю у відношенні поліАДФ-рибозилування. В обсязі значення цього терміна, PARP включає все білки, які кодуються геном parp, їхні мутантні форми та їхні білки, отримані в результаті альтернативного сплайсингу. Крім того, як використовується у описі даного винаходу, термін "PARP" включає аналоги PARP, гомологи та аналоги інших тварин.

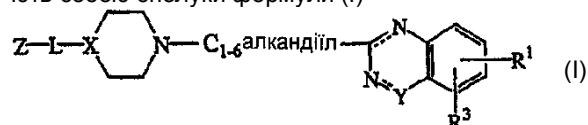
Термін "PARP", включає, але не обмежується тільки ними, PARP-1. В обсяг значення цього терміна можуть бути включені PARP-2, PARP-3, Vauit-PARP (PARP-4), PARP-7 (TiPARP), PARP-8, PARP-9 (Bal), PARP-10, PARP-11, PARP-12, PARP-13, PARP-14, PARP-15, PARP-16, TANK-1, TANK-2 та TANK-3.

Сполуки, які інгібують PARP-1 та танкиразу-2 можуть мати кращі властивості в тім відношенні,

ремішуванням реагентів у присутності придатного розчинника, наприклад, спирту, наприклад, метанолу, етанолу, пропанолу та іншим їм подібних. Для збільшення швидкості реакції можна застосовувати незначно підвищену температуру та добавку каталітичної кількості придатної сильної кислоти, наприклад, хлороводневої кислоти та інших їй подібних.

що вони мають посилену активність стосовно інгібування росту злоякісних клітин.

Даний винахід також включає застосування сполук для одержання лікарського засобу для лікування будь-якого захворювання та порушення у описаних тут тварин, де зазначені сполуки являють собою сполуки формули (I)



їхні N-оксидні форми, фармацевтично прийнятні адитивні солі та стереохімічно ізомерні форми, де

пунктирні лінії позначають необов'язкові зв'язки;

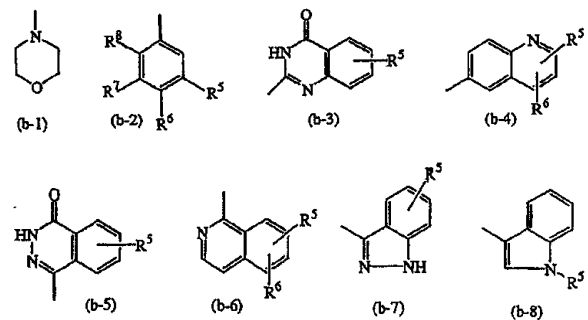
X являє собою $>\text{N-}$, $>\text{CH-}$ або $>\text{CR}^2-$, де R^2 являє собою амінокарбоніл; або

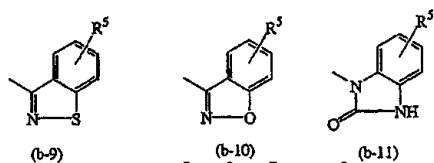
коли X являє собою $>\text{CR}^2-$, тоді R^2 , узятий разом з -L-Z , може утворювати бівалентний радикал формули

$\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-NR}^{10}$ (a-1)

де R^{10} являє собою феніл;

---N---Y--- являє собою -N-C(O)- або -N=CR^4- , де R^4 являє собою гідрокси; R^1 являє собою водень, галоген, C_{1-6} алкілокси групу або C_{1-6} алкіл; R^3 являє собою водень або C_{1-6} алкілокси групу; Z являє собою радикал, обраний з





де кожен R^5 , R^6 , R^7 та R^8 незалежно вибирають із водню, галогену, аміно групи, C_{1-6} алкілу або C_{1-6} алкілокси групи; або

R^7 та R^8 , узяті разом, можуть утворювати бівалентний радикал формули

$-CH_2-CR^9_2-O-$ (с-1)

$-(CH_2)_3-O-$ (с-2)

$-O-(CH_2)_2-O-$ (с-3)

або $-CH=CH-CH=CH-$ (с-4)

де кожен R^9 незалежно вибирають із водню або

C_{1-6} алкілу; та

L являє собою бівалентний радикал, обраний з

$-C(O)-$, $-C(O)-NH-$, $-C(O)-C_{1-6}$ алканділа- або $-C(O)-O-C_{1-6}$ алканділа-; або

L може являти собою безпосередній зв'язок, коли X являє собою $>CR^2-$ або коли Z являє собою радикал формули (b-11).

З погляду властивостей відносно зв'язування PARP сполуки за даним винаходом можуть використовуватися як контрольні сполуки або сполуки, що містять ізотопний індикатор, у випадку яких один з атомів молекули може бути замінений, наприклад, радіоактивним ізотопом.

Для одержання фармацевтичних композицій за даним винаходом ефективну кількість конкретної сполуки у формі кислотної або основної адитивної солі як активний інгредієнт комбінують в однорідну суміш із фармацевтично прийнятним носієм, що може приймати широку розмаїтість форм залежно від бажаної форми препарату для введення. Бажано, щоб ці фармацевтичні композиції перебували в одиничних дозованих формах, переважно придатних для перорального, ректального, підшкірного введення або парентеральної ін'єкції. Наприклад, при одержанні композицій у вигляді пероральної дозованої форми, можуть використовуватися будь-які зі звичайних фармацевтичних середовищ, таких як, наприклад, вода, гліколи, масла, спирти та інші їм подібні, у випадку пероральних рідких препаратів, таких як суспензії, сиропи, еліксири та розчини; або тверді носії, такі як крохмалі, цукри, каолін, речовини, що змашують, зв'язувальні речовини, дезінтегруючі агенти та інші їм подібні, у випадку порошків, пігулок, капсул та таблеток. Внаслідок простоти введення, таблетки та капсули являють собою найбільш кращі пероральні одиничні дозовані форми, у випадку яких звичайно використовують тверді фармацевтичні носії. У випадку композицій для парентерального введення носій звичайно містить стерильну воду, принаймні в більшості випадків, хоча для забезпечення розчинності до складу можуть бути включені інші інгредієнти. Наприклад, можуть бути отримані розчини для ін'єкцій, у яких носій містить фізіологічний розчин, розчин глюкози або суміш фізіологічного розчину та розчину глю-

кози. Також можуть бути отримані суспензії для ін'єкцій, у випадку яких можуть використовуватися придатні рідкі носії, суспендуючі агенти та інші їм подібні. У композиціях, придатних для підшкірного введення, носій необов'язково містить агент, що збільшує проникність, та/або придатний зволожуючий агент, необов'язково комбінований з придатними добавками будь-якої природи в невеликих кількостях, при цьому добавки не приводять до значних шкідливих впливів на шкіру.

Зазначені добавки можуть полегшувати введення через шкіру та/або можуть бути корисними для одержання бажаних композицій. Ці композиції можуть бути введені різними способами, наприклад, у вигляді трансдермального пластиру, у вигляді крапель, у вигляді мазі. Особливо кращим є виготовлення вищевказаних фармацевтичних композицій в одиничних дозованих формах для простоти введення та однаковості дозування. Одиничні дозовані форми, як це використовується в описі та формулі даного винаходу, відносяться до фізично дискретних одиниць, що підходять як одиничні дози, де кожна одиниця містить визначену кількість активного інгредієнта, обчислена для одержання бажаного терапевтичного ефекту, разом з необхідним фармацевтичним носієм. Прикладами таких одиничних дозованих форм є таблетки (включаючи шорсткуваті або покриті таблетки), капсули, пігулки, пакетики з порошками, пластинки, розчини або суспензії для ін'єкцій, форми для введення за допомогою чайних та столових ложок та інші їм подібні, та їх окремі кратні одиниці.

За допомогою сполук за даним винаходом можна лікувати або запобігати ушкодженню тканин у результаті ушкодження або смерті клітин внаслідок некрозу або апоптозу; можна зменшувати ушкодження нервової тканини або тканин серцево-судинної системи, включаючи ушкодження після локальної ішемії, інфаркту міокарда та ушкодження при реперфузії; можна лікувати різні захворювання та стани, які викликані або посилені внаслідок активності PARP; можна продовжувати або збільшувати тривалість життя або проліферативну здатність клітин; можна змінювати експресію генів старіючих клітин; можна підвищувати у клітинах радіочутливість та/або чутливість до хемотерапевтичних засобів. Як правило, інгібування активності PARP захищає клітини від втрати енергії, запобігаючи, у випадку нервових клітин, необоротну деполаризацію нейронів й, таким чином, забезпечуючи нейропротекцію.

За наведеними нижче причинами, даний винахід, крім того, відноситься до способу введення терапевтично ефективної кількості зазначених вище сполук у кількості, достатній для інгібування активності PARP, для лікування або профілактики ушкодження тканин внаслідок ушкодження або смерті клітин внаслідок некрозу або апоптозу, для впливу на активність нейронів, не опосередковану токсичністю NMDA, для впливу на активність нейронів, опосередковану токсичністю NMDA, для лікування ушкодження нервової тканини внаслідок ішемії та ушкодження при реперфузії, неврологічних порушень та нейродегенеративних захворювань; для профілактики або лікування судинного

інсульту; для лікування або профілактики серцево-судинних порушень; для лікування інших станів та/або порушень, таких як м'язова дегенерація, зв'язана зі старінням, СНІД та інші захворювання імунної системи, зв'язані зі старінням, запалення, подагра, артрит, атеросклероз, кахексія, злоякісна пухлина, дегенеративні захворювання кісткової мускулатури, що включають порушення реплікації, зв'язані зі старінням, діабет, травму голови, запальні порушення кишечника (такі як коліти та хвороба Крона), м'язова дистрофія, остеоартрит, остеопороз, хронічна та/або гострий біль (такий як невропатичний біль), ниркова недостатність, ішемія сітківки, септичний шок (такий як ендотоксичний шок), та старіння шкіри, для продовження життя та проліферативної здатності клітин; для зміни експресії генів старіючих клітин; для хемосенсибілізації та/або радіосенсибілізації (гіпоксичних) злоякісних клітин. Даний винахід також відноситься до лікування захворювань та станів у тварин, що включає введення зазначеній тварині терапевтично ефективної кількості зазначених вище сполук.

Зокрема, даний винахід відноситься до способу лікування, профілактики або вповільнення розвитку неврологічного порушення у тварини, що включає введення зазначеній тварині терапевтично ефективної кількості зазначених вище сполук. Неврологічне порушення обране із групи, що складається з периферичної невропатії внаслідок фізичного ушкодження або хворобливого стану, травматичного ушкодження головного мозку, фізичного ушкодження спинного мозку, інсульту, асоційованого з ушкодженням головного мозку, місцевій ішемії, загальній ішемії, ушкодження при реперфузії, демієлінізуючого захворювання та неврологічного порушення, пов'язаного з нейродегенерацією.

Даний винахід також включає застосування сполук формули (I) для інгібування активності PARP для лікування, профілактики або вповільнення ушкодження тканин у результаті ушкодження або загибелі клітин внаслідок некрозу або апоптозу, для лікування, профілактики або вповільнення розвитку неврологічного порушення у тварин.

Термін "профілактика нейродегенерації" включає здатність запобігати нейродегенерації у пацієнтів, яким недавно поставили діагноз нейродегенеративного захворювання, або при ризику розвитку нового дегенеративного захворювання та для запобігання подальшій нейродегенерації у пацієнтів, які вже страждають від нейродегенеративного захворювання або мають симптоми нейродегенеративного захворювання.

Як використовується в даному описі, термін "лікування" включає будь-який спосіб лікування захворювання та/або стану у тварини, зокрема, у людини, та включає: (i) профілактику захворювання та/або стану в суб'єкта, що може бути схильний до захворювання та/або стану, що ще не діагностується; (ii) уповільнення розвитку захворювання та/або стану, тобто припинення його розвитку; (iii) зм'якшення захворювання та/або стану, тобто здійснення ослаблення симптомів захворювання та/або стану.

Як використовується в даному описі, термін "радіосенсибілізатор" визначається як молекула, переважно низькомолекулярна молекула, яку вводять тварині в терапевтично ефективних кількостях для підвищення чутливості клітин до іонізуючої радіації та/або для забезпечення лікування захворювань, які піддаються лікуванню іонізуючою радіацією. Захворювання, які піддаються лікуванню іонізуючою радіацією включають захворювання, що відносяться до новотворів, доброякісні та злоякісні пухлини та злоякісні клітини. Лікування іонізуючою радіацією інших захворювань, які не наведені в даному описі, також охоплюється даним винаходом.

Як використовується в даному описі, термін "хемосенсибілізатор", визначається як молекула, переважно низькомолекулярна молекула, яку вводять тварині в терапевтично ефективних кількостях для підвищення чутливості клітин до хемотерапії та/або для забезпечення лікування захворювань, які піддаються лікуванню хемотерапевтичними засобами. Захворювання, які піддаються лікуванню хемотерапією, включають захворювання, що відносяться до новотворів, доброякісним та злоякісним пухлинам та злоякісним клітинам. Лікування хемотерапією інших захворювань, які не наведені в даному описі, також охоплюється даним винаходом.

Сполуки, композиції та способи за даним винаходом є, зокрема, корисними для лікування або профілактики ушкодження тканин у результаті загибелі або ушкодження клітин внаслідок некрозу або апоптозу.

Сполуки за даним винаходом можуть являти собою "засоби проти злоякісної пухлини", та цей термін також включає "засоби проти росту пухлинних клітин" та "засоби проти новотворів". Наприклад, способи за даним винаходом корисні для лікування злоякісних пухлин та хемосенсибілізації та/або радіосенсибілізації клітин пухлини при злоякісних пухлинах, таких як пухлини, які продукують АСТН, гострий лімфоцитарний лейкоз, гострий нелімфоцитарний лейкоз, рак кори надпочечників, рак сечового міхура, злоякісна пухлина мозку, рак молочної залози, рак шийки матки, хронічний лімфоцитарний лейкоз, хронічний мієлоцитарний лейкоз, рак ободочної та прямої кишки, Т-клітинна лімфома шкіри, рак ендометрія, рак стравоходу, саркома Юинга, рак жовчного міхура, волосатоклітинний лейкоз, рак голови та шиї, лімфома Ходжкина, саркома Капоши, рак нирки, рак печінки, рак легені (дрібноклітинний та/або недрібноклітинний), злоякісний перитонеальний випив, злоякісний плевральний випив, меланома, мезотеліома, множинна міелома, нейробластома, лімфома не Ходжкина, остеосаркома, рак яєчника, рак яєчника із зародкових клітин, рак передміхурової залози, рак підшлункової залози, рак полового члена, ретинобластома, рак шкіри, саркома м'яких тканин, плоскоклітинний рак, рак шлунка, рак яєчка, рак щитовидної залози, трофобластичний новотвір, рак тіла матки, рак піхви, рак зовнішніх жіночих полових органів та пухлина Вільмса.

Таким чином, сполуки за даним винаходом можуть бути використані в якості "радіосенсибілізаторів" та/або "хемосенсибілізаторів".

Відомо, що радіосенсибілізатори підвищують чутливість злоякісних клітин до токсичних ефектів іонізуючої радіації. У літературі передбачається кілька механізмів для способу дії радіосенсибілізаторів, включаючи: радіосенсибілізатори гіпоксичних клітин (наприклад, сполука 2-нітроімідазолу та сполука діоксида бензотріазину), що імітують кисень або, які альтернативно поводять себе подібно біологічним відновлювачам при гіпоксії; радіосенсибілізатори негіпоксичних клітин (наприклад, галогеновані піримідини), які можуть бути аналогами основ ДНК та переважно вбудовуються в ДНК злоякісних пухлин та, таким чином, забезпечують індукуючий опроміненням розрив молекули ДНК та/або запобігають розвитку нормальних механізмів репарації ДНК; та різні інші можливі механізми дії можуть бути припущені для радіосенсибілізаторів при лікуванні захворювання.

У цей час у безлічі різних протоколів лікування радіосенсибілізатори використовуються разом з опроміненням рентгенівськими променями. Приклади радіо сенсибілізаторів, які активуються рентгенівськими променями, включають, але не обмежуються тільки ними, наступні: метронідазол, мізонідазол, десметилмізонідазол, пімонідазол, етанідазол, німоразол, мітоміцин С, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, нікотинамід, 5-бромдезоксисуридин (BUd), 5-йоддезоксисуридин (IUd), бромдезокситидин, фтордезоксисуридин (Fud), гідроксимочевину, цисплатин та терапевтично ефективні аналоги та похідні зазначених вище речовин.

При фотодинамічній терапії (PDT) злоякісних пухлин як радіаційний активатор сенсибілізатора використовують видиме світло. Приклади фотодинамічних радіосенсибілізаторів включають, але не обмежуються тільки ними, наступні: похідні гематопорфірину, фотофрин, похідні бензопорфірину, етіопорфірин олова, феофорбид-а, бактеріохлорофіл-а, нафталоціаніни, фталоціаніни, фталоціанін цинку та терапевтично ефективні аналоги та похідні зазначених вище речовин.

Радіосенсибілізатори можуть бути введені разом з терапевтично ефективною кількістю одного або декількох інших сполук, включаючи, але не обмежуючись тільки ними: сполуки, які забезпечують введення радіосенсибілізаторів у клітини-мішені; сполуки, які контролюють доставку лікарських засобів, харчових добавок та/або кисню в клітини-мішені; хемотерапевтичні засоби, які впливають на пухлину з додатковим опроміненням або без нього; або інші терапевтично ефективні сполуки для лікування злоякісної пухлини або іншого захворювання. Приклади додаткових терапевтичних засобів, які можуть використовуватися разом з радіосенсибілізаторами, включають, але не обмежуються тільки ними: 5-фторурацил, лейковорин, 5'-аміно-5'-дезокситимидин, кисень, карбоген, трансфузію еритроцитів, перфторвуглеці (наприклад, флюосол 10 DA), 2,3-DPG, BW12C, блокатори кальцієвих каналів, пентоксифілін, антiangіогенні сполуки, гідралазин та LBSO. Приклади хемотера-

певтичних засобів, які можуть використовуватися разом з радіосенсибілізаторами, включають, але не обмежуються тільки ними: адриаміцин, камптотецин, карбоплатин, цисплатин, даунорубіцин, доцетаксел, доксорубіцин, інтерферон (альфа, бета, гама), інтерлейкин-2, іринотекан, паклітаксел, топотекан та терапевтично ефективні аналоги та похідні зазначених вище засобів.

Хемосенсибілізатори можуть бути введені разом з терапевтично ефективною кількістю одного або декількох інших сполук, включаючи, але не обмежуючись тільки ними: сполуки, які забезпечують транспортування хемосенсибілізаторів у клітини-мішені; сполуки, які контролюють доставку лікарських засобів, харчових добавок та/або кисню в клітини-мішені; хемотерапевтичні засоби, які впливають на пухлину, або інші терапевтично ефективні сполуки для лікування злоякісної пухлини або іншого захворювання. Приклади додаткових терапевтичних засобів, які можуть застосовуватися разом з хемосенсибілізаторами, включають, але не обмежуються тільки ними: метилуючі агенти, інгібітори топоізомерази I та інші хемотерапевтичні засоби, такі як цисплатин та блеомицин.

Сполуки формули (I) також можуть використовуватися для виявлення або ідентифікації PARP та, більш конкретно, рецептора PARP-1. Для цієї мети до сполук формули (I) можна приєднувати мітку. Зазначена мітка може бути обрана із групи, що складається з радіоізотопної мітки, спінової мітки, антигенної мітки, ферментної мітки, флуоресцентної групи або хемілюмінесцентної групи.

Фахівці в даній галузі легко можуть визначити ефективну кількість із результатів тесту, представленого нижче. Як правило, передбачається, що ефективна кількість може складати від 0,001мг/кг до 100мг/кг маси тіла, та, зокрема, від 0,005мг/кг до 10мг/кг маси тіла. Може бути доцільним введення необхідної дози у вигляді двох, трьох, чотирьох або більше суб-доз протягом доби з відповідними інтервалами. Зазначені суб-دوزи можуть бути включені до складу в якості одиничних дозованих форм, наприклад, що містять від 0,05 до 500мг, та, зокрема, від 0,1мг до 200мг активного інгредієнта в одиничній дозованій формі.

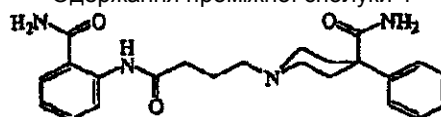
Експериментальна частина

Надалі "DCM" означає дихлорметан, "DMF" означає N,N-диметилформамід, "MeOH" означає метанол, "MIK" означає метил ізобутил кетон, "MEK" означає метилетилкетон, "TEA" означає триетиламін та "THF" означає тетрагідрофуран.

А. Одержання проміжних сполук

Приклад А1

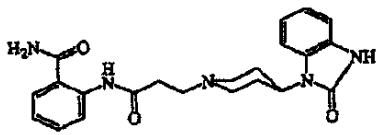
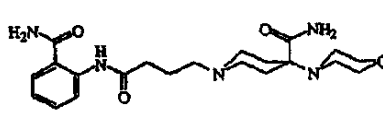
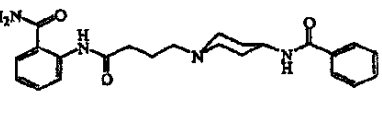
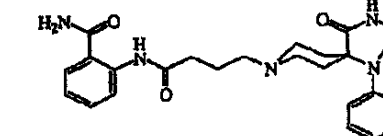
Одержання проміжної сполуки 1



Суміш 2-[(4-хлор-1-оксобутил)аміно]бензаміду (0,03моль), 4-феніл-4-піперидинкарбоксаміду (0,03моль) та TEA (0,1моль) в ацетонітрилі (150мл) перемішували та кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі, потім розчинник випарювали та до залишку додавали воду. Мас-

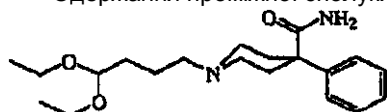
лянистий шар екстрагували трихлорметаном, висушували, фільтрували та випарювали розчинник. Залишок очищали, пропускаючи через силікагель на скляному фільтрі (елюент: трихлорметан/MeOH

95/5). Фракції продукту збирали та випарювали розчинник з одержанням 5г (40,8%) проміжної сполуки 1.

	
Проміжна сполука 2; Приклад [A1]; температура плавлення 144,2° C	Проміжна сполука 3; Приклад [A1]
	
Проміжна сполука 4; Приклад [A1]	Проміжна сполука 5; Приклад [A1]; температура плавлення 210° C

Приклад A2

Одержання проміжної сполуки 6

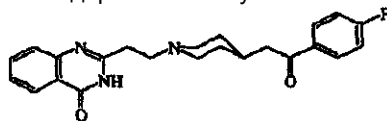


Суміш 4-хлор-1,1-діетоксибутану (0,05моль), 4-феніл-4-піперидинкарбоксаміду (0,03моль), карбонату натрію (0,05моль) та йодиду калію (еквів.) в 4-метил-2-пентаноні (250мл) перемішували та кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі, потім реакційну суміш прохолоджували, додавали воду та розділяли шари. Органічний шар висушували, фільтрували та випарювали розчинник з одержанням 9г (86%) проміжної сполуки 6.

В. Одержання цільових сполук

Приклад B1

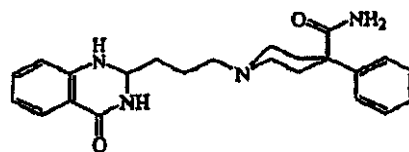
Одержання сполуки 3



Суміш 2-[(1-оксо-1-пропеніл)аміно]бензаміду (0,02моль), 1-(4-фторфеніл)-2-(4-піперидиніл)етанону (0,02моль) та бікарбонату натрію (4г) в 2-пропанолі (150мл) перемішували та кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі, потім реакційну суміш фільтрували у гарячому стані та випарювали розчинник. Залишок двічі очищали за допомогою колоночної хроматографії на силікагелі (елюент: трихлорметан/MeOH 95/5). Фракції продукту збирали та випарювали розчинник. Залишок кристалізували з 2-пропанолу та осад, що утворився, збирали з одержанням 2г (25%) сполуки 3, температура плавлення 159,1°С.

Приклад B2

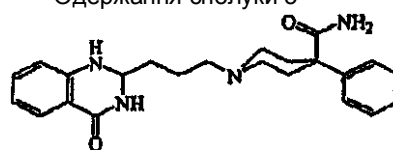
Одержання сполуки 4



Суміш проміжної сполуки 1 (0,012моль) у гідроксиді натрію (60мл) та етанолі (100мл) перемішували та кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 1,5 годин, потім розчинник випарювали та до залишку додавали воду. Маслянистий шар екстрагували трихлорметаном, висушували, фільтрували та випарювали розчинник. Залишок кристалізували з МІК/2-пропанол, потім бажаний продукт збирали та висушували з одержанням 2г (41,7%) сполуки 4, температура плавлення 138,9°С.

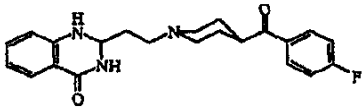
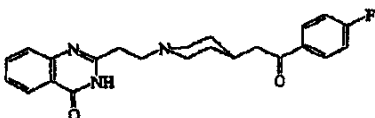
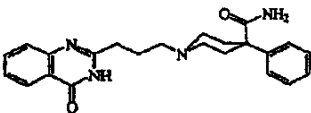
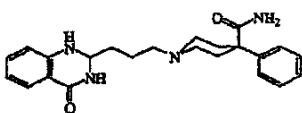
Приклад B3

Одержання сполуки 5



Суміш 2-амінобензаміду (0,027моль) та проміжної сполуки 6 (0,027моль) в етанолі (100мл) нагрівали та підкисляли соляною кислотою с.р. (3мл). Реакційну суміш перемішували та кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі, потім розчинник випарювали та до залишку додавали воду та концентрований розчин NH₄OH. Осад, що утворився, відфільтровували та розчиняли в трихлорметані, потім висушували та фільтрували. Розчинник випарювали, а залишок кристалізували з MeOH, осад, що потім утворився, збирали та висушували з одержанням 3г (28%) сполуки 5, температура плавлення 216,1°С.

В таблиці F-1 наведений список сполук, які отримані відповідно до одного з вищенаведених прикладів.

	
Сполука № 1, EP 13612	Сполука № 3; Приклад [B1]; температура плавлення 159,1°С
	
Сполука № 4; Приклад [B2]; температура плавлення 138,9° С	Сполука № 5; Приклад [B3]; температура плавлення 216,1° С



Фармакологічний приклад

Сцинтиляційний аналіз зближення (SPA) *in vitro* на інгібуючу активність PARP-1

Сполуки за даним винаходом тестували в аналізі *in vitro*, заснованому на методі SPA (запатентований Amersham Pharmacia Biotech).

У принципі, аналіз заснований на загальноприйнятому методі SPA для визначення поліАДФ-рибозилування біотинільованих білків-мішеней, тобто гістонів. Це рибозилування індують, використовуючи фермент PARP-1, активований ДНК із одностанцюговими розривами, та [³H]-нікотинамідадениндинуклеотидом ([³H]-NAD⁺) як донором АДФ-рибозилів.

В якості індуктора активності ферменту PARP-1, одержували ДНК із одностанцюговими розривами. Для цього 25мг ДНК (постачальник: Sigma) розчиняли в 25мл буферу для ДНК (10мМ Tris-HCl, pH7,4; 0,5мг/мл бичачі сироваткові альбуміни (BSA); 5мМ MgCl₂·6H₂O та 1мМ KCl), до якого додавали 50мкл розчину ДНК (1мг/мл в 0,15М NaCl). Після інкубації протягом 90 хвилин при температурі 37°C, реакцію зупиняли за допомогою додавання 1,45г NaCl, з наступною додатковою інкубацією при температурі 58°C протягом 15 хвилин. Реакційну суміш охолоджували на льоду та проводили діаліз при температурі 4°C протягом відповідно 1,5 та 2 годин проти 1,5л 0,2М KCl, та двічі проти 1,5л 0,01М KCl протягом 1,5 та 2 годин, відповідно. Суміш розділяли на аліквоти та зберігали при температурі -20°C. Гістони (1мг/мл, тип II-A, постачальник: Sigma) біотинільовали з використанням набору для біотинільування Amersham та зберігали розділеними на аліквоти, при температурі -20°C. Отримували вихідний розчин 100мг/мл гранул SPA із полівінілтолуолу (PVT) (постачальник: Amersham) у PBS. Вихідний розчин [³H]-NAD⁺ отримували при додаванні 120мкл [³H]-NAD⁺ (0,1мКи/мл, постачальник: NEN) до 6мл буферу для інкубації (50мМ Tris/HCl, pH8; 0,2мМ DTT; 4мМ MgCl₂). Отримували розчин 4мМ NAD⁺ (постачальник: Roche) у буфері для інкубації (із 100мМ вихідного розчину у воді, який зберігали при температурі -20°C). Фермент PARP-1 отримували з використанням відомих в даній галузі методик, тобто клонування та експресія білку, з використанням на початковому етапі кДНК печінки людини. Інформацію, яка стосується білкової послідовності фермента PARP-1, що використовується, включаючи посилання на літературні джерела, можна знайти в базі даних Swiss-Prot з первинним номером доступу P09874. Біотинільовані гістони та гранули PVT-SPA перемішували та попередньо інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Фермент PARP-1 (концентрація залежить від партії) змішували з ДНК з одностанцюговими розривами та суміш попередньо інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4°C. Рівні частини розчину гістони/гранули PVT-SPA та розчину ферменту PARP-1/ДНК змішували та у 96-лункові мікротитраційні планшети додавали 75мкл отриманої суміші разом із 1мкл сполуки в ДМСО та 25мкл [³H]-NAD⁺ на одну лунку. Кінцеві концентрації в інкубаційній суміші складали 2мкг/мл для біо-

тинільованих гістонів 2мг/мл для гранул PVT-SPA, 2мкг/мл для ДНК із одностанцюговими розривами та між 5 та 10мкг/мл для ферменту PARP-1. Після інкубації суміші протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, реакцію зупиняли за допомогою додавання 100мкл 4мМ NAD⁺ у буфері для інкубації (кінцева концентрація 2мМ) та вміст планшетів перемішували.

Гранулам давали можливість осаджуватися протягом щонайменше 15 хвилин та планшети переносили у TopCountNXT™ (Packard) для сцинтиляційного виміру, значення виражалися як число імпульсів у хвилину (срт). Для кожного експерименту, паралельно досліджували контролі (утримуючі фермент PARP-1 та ДМСО без сполуки), просту інкубацію (яка включала ДМСО, але без ферменту PARP-1 або сполуки) та зразки (які включали фермент PARP-1 та сполуки розчинені в ДМСО). Всі сполуки, що тестувалися, розчиняли та із часом додатково розчиняли в ДМСО. У першому прикладі, сполуки тестували при концентрації 10⁻⁵М. Якщо сполуки показували активність при 10⁻⁵М, будували криву доза-відповідь, де сполуки тестували при концентраціях між 10⁻⁵М та 10⁻⁸М. У кожному тесті зі значень для контролю та зразка віднімали значення для простого розчину. Контрольний зразок показував максимальну активність ферменту PARP-1. Для кожного зразка кількість срт виражали у вигляді процентної частки від середнього значення срт для контролів. Коли це доцільно, обчислювали значення IC₅₀ (концентрація лікарського засобу, необхідна для зниження активності ферменту PARP-1 до 50% від активності в контролі) з використанням лінійної інтерполяції між експериментальними крапками безпосередньо вище та нижче за рівень 50%. Ефекти сполук, які тестувалися, представлені у вигляді pIC₅₀ (значення негативного логарифма значення IC₅₀). Для перевірки аналізу SPA як контрольні сполуки використовували 4-аміно-1,8-нафталімід. Сполуки, які тестували, показували інгібаторну активність при початковій досліджуваній концентрації 10⁻⁵М (див. таблицю 2).

Аналіз фільтрування *in vitro* на інгібаторну активність PARP-1

Сполуки за даним винаходом тестували в аналізі фільтрування *in vitro*, оцінюючи активність PARP-1 (що запускали у присутності ДНК із одностанцюговими розривами) за допомогою його активності у відношенні поліАДФ-рибозилування гістонів з використанням [³²P]-NAD як донора АДФ-рибозилів. Радіоактивні рибозильовані гістони осаджували за допомогою трихлороцтової кислоти (TCA) у 96-планшетах для фільтрації та проводили вимір вбудованого [³²P] з використанням сцинтиляційного лічильника.

Отримували суміш гістонів (вихідний розчин: 5мг/мл в H₂O), NAD⁺ (вихідний розчин: 100мМ в H₂O), та [³²P]-NAD⁺ у буфері для інкубації (50мМ Tris/HCl, pH8; 0,2мМ DTT; 4мМ MgCl₂). Також одержували суміш ферменту PARP-1 (5-10мкг/мл) та ДНК із одностанцюговими розривами. ДНК із одностанцюговими розривами одержували, як описано для SPA *in vitro* для інгібуючої активності PARP-1.

75мкл суміші ферменту PARP-1/ДНК разом з 1мкл сполуки в ДМСО та 25мкл суміші гістони- $\text{NAD}^+/[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ додавали на кожну лунку 96-лункового планшета для фільтрування (0,45мкм, постачальник Millipore). Кінцеві концентрації в інкубаційній суміші становили 2мкг/мл для гістонів, 0,1мМ для NAD^+ , 200мкмМ (0,5мкмКю) для $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ та 2мкг/мл для ДНК із одноланцюговими розривами. Планшети інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, реакцію зупиняли за допомогою додавання 10мкл крижаного 100% TCA та потім додавали 10мкл крижаного розчину BSA (1% в H_2O). Білкової фракції давали можливість випасти в осад протягом 10 хвилин при температурі 4°C та планшети фільтрували у вакуумі. Планшети послідовно промивали, для кожної лунки, 1мл 10% крижаного TCA, 1мл 5% крижаного TCA та 1мл 5% TCA при кімнатній температурі. Нарешті, у кожну лунку додавали 100мкл розчину для сцинтиляції (Microscint 40, Packard), планшети переносили в TopCountNXT™ (постачальник: Packard) для сцинтиляційних вимірів та значення виражали в кількості імпульсів у хвилину (срт). Для кожного експерименту паралельно досліджували контрольну інкубацію (що містить фермент PARP-1 та ДМСО без сполуки), просту інкубацію (що містить ДМСО, але без ферменту PARP-1 або сполуки) та зразки (що містить фермент PARP-1 та сполуку розчинені в ДМСО). Всі сполуки, що тестували, розчиняли та із часом додатково розбавляли в ДМСО. У першому прикладі, сполуки тестували при концентрації 10^{-5}М . Якщо сполука показували активність при 10^{-5}М , будували криву доза-відповідь, де сполуки тестували при концентраціях між 10^{-5}М і 10^{-8}М . У кожному тесті зі значень для контролю та зразка віднімали значення для простого розчину. Контрольний зразок показував максимальну активність ферменту PARP-1. Для кожного зразка кількість срт виражали у вигляді відсоткової частки від середнього значення срт для контролів. Коли це доцільно, обчислювали значення IC_{50} (концентрація лікарського засобу, необхідна для зниження активності ферменту PARP-1 до 50% від активності в контролі) з використанням лінійної інтерполяції між експериментальними крапками безпосередньо вище та нижче за рівень 50%. Ефекти сполук, що тестували, представлені у вигляді pIC_{50} (значення негативного логарифма значення IC_{50}). Для перевірки аналізу фільтрування як контрольну сполуку використовували 4-аміно-1,8-нафталімід. Сполуки, які тестували, показували інгібіторну активність при початковій досліджуваній концентрації 10^{-5}М (див. таблицю 2).

Сцинтиляційний аналіз зближення (SPA) *in vitro* на інгібіторну активність TANK-2

Сполуки за даним винаходом тестували в аналізі *in vitro*, заснованому на методі SPA з використанням планшетів Ni Flash (96- або 384-лункових).

У принципі, аналіз заснований на методі SPA для визначення поліАДФ-рибозилування білка

TANK-2 з використанням й $[^3\text{H}]\text{-}$ нікотинамідаденіндинуклеотиду ($[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$) як донор АДФ-рибозилів.

Вихідний розчин $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+/\text{NAD}$ одержували за допомогою додавання 64,6мкл $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$ (0,1мС/мл, постачальник: Perkin Elmer) та 46,7мкл вихідного розчину NAD (10,7мМ, що зберігається при температурі -20°C, постачальник Roche) до 1888,7мкл буфера для аналізу (60мМ Tris/HCl, pH 7,4; 0,9мМ DTT; 6мМ MgCl_2). Фермент TANK-2 одержували, як описано в [EP 1238063]. 60мкл буфера для аналізу разом з 1мкл сполуки в ДМСО, 20мкл $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+/\text{NAD}$ та 20мкл ферменту TANK-2 (кінцева концентрація 6мкг/мл) додавали на лунку в 96-лунковий планшет з покриттям Ni (Perkin Elmer). Після інкубації суміші протягом 120 хвилин при кімнатній температурі реакцію зупиняли за допомогою додавання 60мкл стоп-реагенту (42,6мг NAD в 6мл H_2O). Планшети накривали пристосуванням для накривання планшетів та поміщали в TopCountNXT™ (Packard) для сцинтиляційного виміру. Значення виражали в кількості імпульсів у хвилину (срт). Для кожного експерименту паралельно досліджували контроль (що містять фермент TANK-2 та ДМСО без сполуки), просту інкубацію (що містить ДМСО, але без ферменту TANK-2 або сполуки) та зразки (що містять фермент TANK-2 та сполуки розчинені в ДМСО). Всі сполуки, які тестували, розчиняли та із часом додатково розбавляли в ДМСО. У першому прикладі, сполуки тестували при концентрації 10^{-5}М . Якщо сполуки показували активність при 10^{-5}М , будували криву доза-відповідь, де сполуки тестували при концентраціях між 10^{-5}М та 10^{-8}М . У кожному тесті зі значень для контролю та зразка віднімали значення для порожнього розчину. Контрольний зразок показував максимальну активність ферменту TANK-2. Для кожного зразка кількість срт виражали у вигляді відсоткової частки від середнього значення срт для контролів. Коли це доцільно, обчислювали значення IC_{50} (концентрація лікарського засобу, необхідна для зниження активності ферменту TANK-2 до 50% від активності в контролі) з використанням лінійної інтерполяції між експериментальними крапками безпосередньо вище та нижче за рівень 50%. Ефекти сполук, які тестували, представлені у вигляді pIC_{50} (значення негативного логарифма значення IC_{50}). Для перевірки аналізу SPA як контрольні сполуки використовували 3-амінобензамід та 4-аміно-1,8-нафталімід. Уданому випадку описаний аналіз із використанням 96-лункових планшетів. В аналізі з використанням 384-лункових планшетів використовували такі ж кінцеві концентрації та значення були адаптовані. Якщо результати досліджень із 96-лунковими планшетами були доступні, ці результати включали в таблицю 2, в іншому випадку показані результати аналізу з 384-лунковими планшетами.

Таблиця 2

№ Сполуки	In vitro фільтраційний аналіз PARP-1 pIC ₅₀	In vitro SPA аналіз PARP-1 pIC ₅₀	In vitro SPA TANK-2 pIC ₅₀
1			<5
2	5,303	6,414	<5
3	5,371	6,252	5,605
4	7,115	7,699	<5
5	6,523	7,64	<5
6	5,669	6,75	5,129
7	5,381	6,233	>5
8	5,804	6,627	<5
9	5,243	6,214	<5
10	5	6,376	5,674
11	5,942	6,725	<5
12	6,172	6,931	<5
13	5,332	6,497	6,028
14	6,263	7,232	<5

Сполуки, крім того, можна оцінювати в аналізі хемісенсibiliзації або радіосенсибилізації клітин, в аналізі, при якому вимірюють інгібування ендоген-

ної активності PARP-1 у клітинних лініях злоякісної пухлини та, нарешті, у тесті радіосенсибилізації in vivo.