



УКРАЇНА

(19) UA (11) 88012 (13) C2

(51) МПК (2009)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

A61K 31/517

A61P 35/00

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

(54) ПОХІДНІ ХІНАЗОЛІНДІОНУ ЯК ІНГІБІТОРИ PARP

1

(21) a200612978

(22) 28.06.2005

(24) 10.09.2009

(86) PCT/EP2005/053031, 28.06.2005

(31) 04076885.5

(32) 30.06.2004

(33) EP

(46) 10.09.2009, Бюл.№ 17, 2009 р.

(72) КЕННІС ЛЮДО ЕДМОН ЖОЗЕФІН, ВЕ, МЕР-
ТЕНС ДЖОЗЕФУС КАРОЛУС, ВЕ/ВЕ, ВАН ДУН
ЯКОБУС АЛЬФОНСУС ЙОЗЕФУС, ВЕ, СОМЕРС
МАРІЯ ВІКТОРІНА ФРАНЦИСКА, ВЕ/ВЕ, ВУТЕРС
ВАЛЬТЕР БУДЕВІЙН ЛЕОПОЛЬД, ВЕ

(73) ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА Н.В., ВЕ

(56) WO 91/12006 A; 22.08.1991

EP 0013612 A; 23.07.1980

US 3274194; 20.09.1966

US 2919425 A; 11.11.1975

EP 0391462 A; 10.10.1990

WO 99/29687 A; 17.06.1999

Takai H. et al. XP002333132

S. Hayao et al. XP 002347459

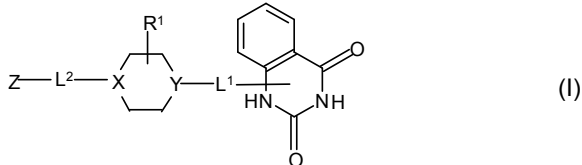
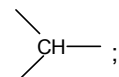
G. Costantino; XP 002347460

WPI/Derwent; XP 002347462

Herndon J. et al. XP 000941731

WO 02/48117 A; 20.06.2002

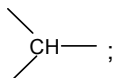

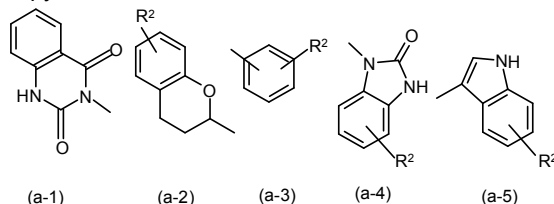
(57) 1. Сполука формули (I)

її форми N-оксидів, фармацевтично прийнятні
адитивні солі та стереохімічно ізомерні форми, декожний X незалежно позначає  або

2

та, коли X позначає ,

то Y позначає

кожний Y незалежно позначає  абоза винятком випадку, коли X позначає ,тоді Y позначає .L¹ являє собою прямий зв'язок або двовалентний
радикал, вибраний з -C₁₋₆алкандіїлу-;L² являє собою прямий зв'язок або двовалентний
радикал, вибраний з карбонілу, -C₁₋₆алкандіїлу-, -
(гідроксі)C₁₋₆алкандіїлу-, -C(O)-C₁₋₆алкандіїлу-або -
C₁₋₆алкандіїл-C(O)-;R¹ являє собою атом водню або гідроксильну гру-
пу;Z являє собою атом водню або радикал, вибраний
з групи, що складається зде кожний R² незалежно вибрано з атома водню,
атома галогену або C₁₋₆алкілу,
за умови, що хіназоліндіоновий фрагмент приєд-
наний до частини молекули, що залишилася, по
NH-фрагменту в 1-му положенні, та у цьому випа-
дку він заміщує атом водню; та за умови, що ви-
ключаються сполуки


(13) C2

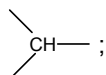
(11) 88012


(19) UA

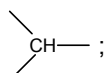
1-[1-[(2S)-2-[(2R)-3,4-дигідро-2H-1-бензопіран-2-іл]-2-гідроксіетил]-4-піперидиніл]-2,4(1H,3H)-хіназоліндіон,
1-[2-4-[(4-фторбензоіл)-1-піперидиніл]етил]-2,4(1H,3H)-хіназоліндіон та
1-[3-[4-(4-фторбензоіл)-1-піперидиніл]пропіл]-2,4(1H,3H)-хіназоліндіон.

2. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що

кожний X незалежно позначає  або



кожний Y незалежно позначає  або




L¹ являє собою прямий зв'язок або двохвалентний радикал, вибраний з -C₁₋₆алкандіїлу-;

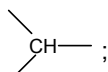
L² являє собою прямий зв'язок або двохвалентний радикал, вибраний з карбонілу, -C₁₋₆алкандіїлу-, -C₁₋₆алкандіїлу-, -(гідроксі)C₁₋₆алкандіїлу- або -C(O)-C₁₋₆алкандіїлу-;

R¹ позначає атом водню або гідроксильну групу;

Z позначає атом водню або радикал, вибраний з (a-1), (a-2), (a-3), (a-4) або (a-5); та кожний R² незалежно вибрано з атома водню, атома галогену або C₁₋₆алкілу.

3. Сполука за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що

кожний X позначає  ;

кожний Y позначає  ;

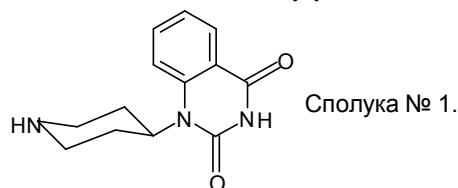
L¹ позначає прямий зв'язок;

L² позначає прямий зв'язок;

R¹ позначає атом водню та

Z позначає атом водню.

4. Сполука за будь-яким з пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що являє собою сполуку № 1

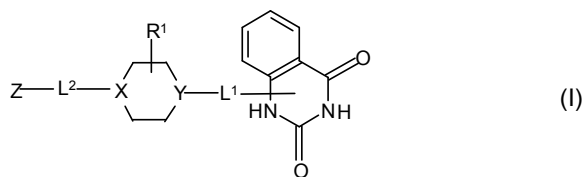


5. Сполука за будь-яким з пп. 1-4 для застосування як лікарського засобу.


6. Фармацевтична композиція, яка містить фармацевтично прийнятні носії та терапевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-4 як активний інгредієнт.

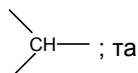
7. Спосіб отримання фармацевтичної композиції за п. 6, який **відрізняється** тим, що ретельно перемішують фармацевтично прийнятні носії та сполуку за будь-яким з пп. 1-4.


8. Застосування сполуки для виготовлення лікарського засобу для лікування захворювання, опосередкованого PARP, де зазначена сполука являє собою сполуку формули (I)

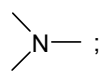



її N-оксидні форми, фармацевтично прийнятні адитивні солі та стереохімічно ізомерні форми, де

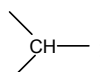
кожний X незалежно позначає  або





коли X позначає , тоді Y позначає



кожний Y незалежно позначає  або



за винятком випадку, коли X позначає ,

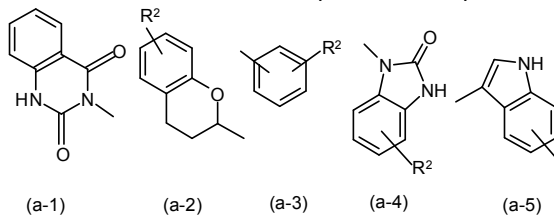
тоді Y позначає  ;

L¹ позначає прямий зв'язок або двовалентний радикал, вибраний із -C₁₋₆алкандіїлу-;

L² позначає прямий зв'язок або двовалентний радикал, вибраний із карбонілу, -C₁₋₆алкандіїлу-, -(гідроксі)C₁₋₆алкандіїлу-, -C(O)-C₁₋₆алкандіїлу- або -C₁₋₆алкандіїл-C(O)-;

R¹ позначає атом водню або гідроксильну групу;

Z позначає атом водню або радикал, вибраний із



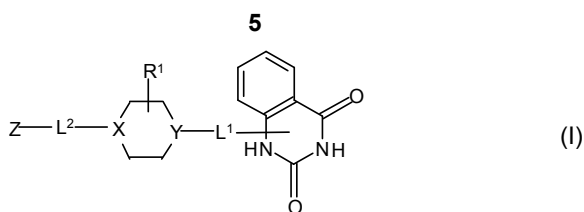
де кожний R² незалежно вибрано з атома водню, атома галогену або C₁₋₆алкілу.

9. Застосування за п. 8 інгібітора PARP формули (I) для виготовлення лікарського засобу для лікування захворювання, опосередкованого PARP-1.

10. Застосування за п. 8 або 9, яке **відрізняється** тим, що лікування включає хемосенсибілізацію.

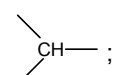
11. Застосування за п. 8 або 9, яке **відрізняється** тим, що лікування включає радіосенсибілізацію.

12. Комбінація сполуки разом із хімотерапевтичним засобом, яка **відрізняється** тим, що зазначена сполука являє собою сполуку формули (I)

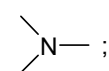


її N-оксидні форми, фармацевтично прийнятні адитивні солі та стереохімічно ізомерні форми, де

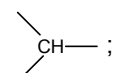
кожний X незалежно позначає або



та, коли X позначає , тоді Y позначає

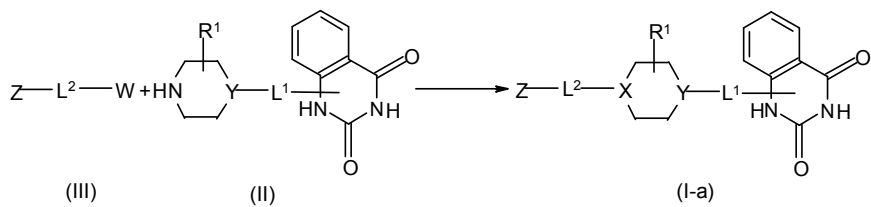


кожний Y незалежно позначає або



за винятком випадку, коли X позначає ,

тоді Y позначає



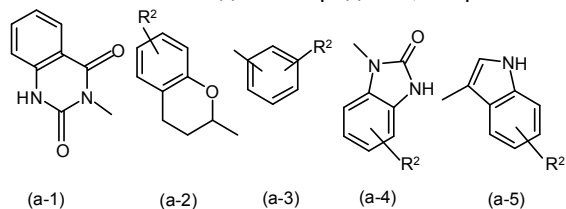
b) взаємодію проміжної сполуки формули (IV) із проміжною сполукою формули (V), де W позначає придатну кінцеву групу, з утворенням сполуки фо-

6
L¹ позначає прямий зв'язок або двовалентний радикал, вибраний із -C₁₋₆алкандіїлу-,

L² позначає прямий зв'язок або двовалентний радикал, вибраний із карбонілу, -C₁₋₆алкандіїлу-, - (гідроксі)C₁₋₆алкандіїлу-, -C(O)-C₁₋₆алкандіїлу-або -C₁₋₆алкандіїл-C(O)-;

R¹ позначає атом водню або гідроксильну групу;

Z позначає атом водню або радикал, вибраний із



де кожний R² незалежно вибрано із атома водню, атома галогену або C₁₋₆алкілу.

13. Спосіб отримання сполуки формули (I), в якому здійснюють

a) взаємодію проміжної сполуки формули (II) із проміжною сполукою формули (III), де W позначає придатну кінцеву групу, з утворенням сполуки фо-

рмули (1-a), де X позначає , в інертному розчиннику та при додаванні придатної основи

рмули (I-b), де Y позначає , в інертному розчиннику та при додаванні придатної основи.

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. Зазначене 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).

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)трансферазу 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 анкiринових повторів, гомологічних білку цитоскелета анкiрину 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'язаними полімеразами 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-єднального 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.

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 гістони, 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 активації PARP більш ніж у 500 разів.

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.

Полі(АДФ-рибози) синтаза також залучена до індукованої експресії ряду генів, необхідних для запального відклику. Інгібітори PARP придушують продукцію індукбельної синтази 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 травм 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 кістковому 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 кістковий м'язову тканину після реперфузійного ушкодження.

Активність 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 зернистості 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 нейродегенеративного 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 забезпечують 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 Гентингтона, 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, обробленої 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 тринітробензолсульфонові 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 артриту. 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 I та іншими хемотерапевтичними засобами, такими як цисплатин та блеоміцин. Безліч досліджень із використанням "нокауту" мишей, моделей із трансдомінантним інгібуванням (сверхекспресія Днк-єднального домену), антизначенневих 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.

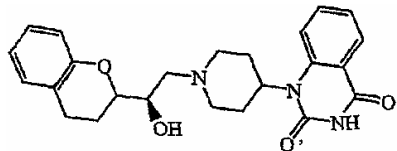
Інгібітори PARP використовуються для лікування злоякісної пухлини. Крім того, у патенті США No.5177075 описані невелика кількість ізохіолінів, які використовуються для посилення летальних ефектів іонізуючої радіації або хемотерапевтичних

засобів на клітини злоякісної пухлини. Weltin et al. в "Effect of 6(5-Phenanthridimone), 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 Biophysics & Molecular Biology* 2005, 88: 143-172.

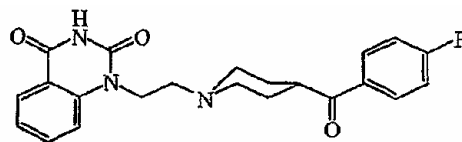
Зберігається потреба в ефективних та потужних інгібіторах PARP та, більш конкретно, інгібіторах PARP-1, які викликають мінімальні побічні дії. Даний винахід відноситься до сполук, композицій для інгібування активності PARP та способів інгібування активності PARP для лікування злоякісної пухлини та/або 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 ЕР 2036073, який опубліковано 17 червня 1999, розкриває заміщені похідні хіназолідину. Зазначені сполуки мають фундаментальні релаксуючі властивості. Зокрема, розкривається сполука 1-[1-[(2S)-2-[(2R)-3,4-дигідро-2H-1-бензопіран-2-іл]-2-гідроксиетил]-4-піперидиніл]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №9 у даному описі).

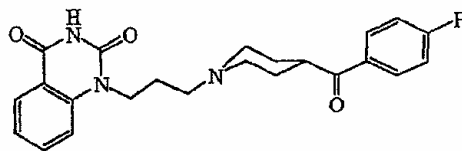


Сполука 9

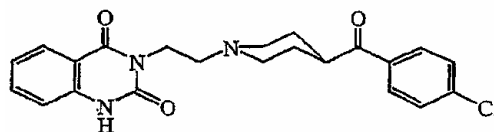
Патент ЕР 13612, який опубліковано 11 листопада 1983, розкриває заміщені похідні сполуки піперидинілкхіназоліну. Сполуки, які описуються, являють собою антагоністи серотоніну. Зокрема, розкриваються сполуки 1-[2-4-[(4-фторбензоїл)-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №10 у даному описі), 1-[3-[4-(4-фторбензоїл)-1-піперидиніл]пропіл]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №11 у даному описі), 3-[2-[4-(4-хлорбензоїл)-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №12 у даному описі), 3-[2-[4-(4-фторфеніл)гідроксиметил]-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №13 у даному описі).



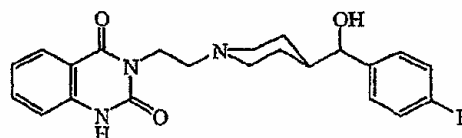
Сполука 10



Сполука 11

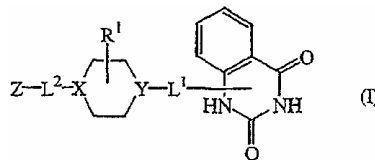


Сполука 12



Сполука 13

Даний винахід відноситься до сполук формули (I)



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

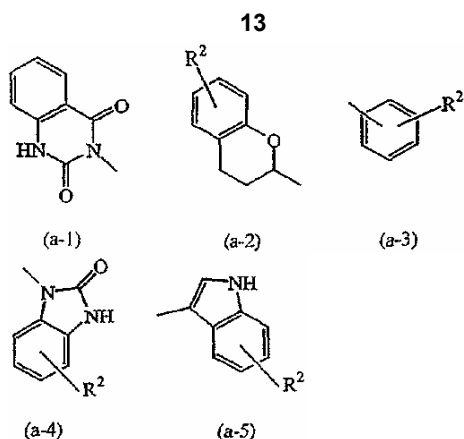
форм, де кожний X незалежно позначає або ; та, коли X позначає , то Y позначає ; кожний Y незалежно позначає або ; за винятком випадку, коли X позначає , та тоді Y позначає .

L¹ являє собою прямий зв'язок або двовалентний радикал, обраний з -C₁₋₆алканділу-;

L² являє собою прямий зв'язок або двовалентний радикал, обраний з карбонілу, -C₁₋₆алканділу-, -(гідрокси)C₁₋₆алканділу-, -C(O)-C₁₋₆алканділу- або -C₁₋₆алканділу-C(O)-;

R¹ являє собою атом водню або гідроксильну групу;

Z являє собою атом водню або радикал, обраний з групи, що складається з



де кожний R^2 незалежно обрано з атома водню, атома галогену або C_{1-6} алкілу, за умови, що виключаються сполуки 1-[1-[(2S)-2-[(2R)-3,4-дигідро-2H-1-бензопіран-2-іл]-2-гідроксиетил]-4-піперидиніл]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон, 1-[2-4-[(4-фторбензоіл)-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон, 1-[3-[4-(4-фторбензоіл)-1-піперидиніл]пропіл]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон, 3-[2-[4-(4-хлорбензоіл)-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон та 3-[2-[4-(4-фторфеніл)гідроксиметил]-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон.

У тому випадку, коли Z являє собою гетероциклічну кільцеву систему, яка включає фрагмент $-CH_2-$, $-CH=$ або $-NH-$, то замісник R^2 та/або частина молекули, що залишилася, можуть бути приєднані до цього атому вуглецю/або атому азоту, та у цьому випадку заміщені один або обидва атоми водню.

В сполуках формули (I) хіназоліндіоновий фрагмент може бути приєднаним до частини молекули, що залишилася, по $-NH$ -фрагментам у 1-му або 3-му положенні, та у цьому випадку він заміщує атом водню.

Сполуки формули (I) можуть також існувати в їхніх таутомерних формах. Мається на увазі, що такі форми, хоча й не явно показані в наведеній вище формулі, входять до обсягу даного винаходу.

На ряд термінів, які використовуються у зазначених вище визначеннях та надалі, роз'яснення наводяться нижче. Ці терміни іноді використовуються самі по собі або в складних термінах.

Як використовується в зазначених вище визначеннях та надалі, галоген є загальною назвою для фтору, хлору, бромов та йоду; тригалогенметил відноситься до метилу, що містить три однакових або різних замісники галогену, наприклад, трифторметил; C_{1-6} алкіл відноситься до нерозгалужених та розгалужених насичених вуглеводневих радикалів з кількістю атомів вуглецю від 1 до 6, таким як, наприклад, метил, етил, пропіл, бутил, пентил, гексил, 1-метилетил, 2-метилпропіл, 2-метилбутил, 2-метилпентил та подібні; $-C_{1-6}$ алкандііл- відноситься до двовалентних нерозгалужених та розгалужених насичених вуглеводневих радикалів з кількістю атомів вуглецю від 1 до 6, таким як, наприклад, метилен, 1,2-етандііл, 1,3-пропандііл, 1,4-бутандііл, 1,5-пентандііл, 1,6-гександііл та їхнім розгалуженим ізомерам, таким

як 2-метилпентандііл, 3-метилпентандііл, 2,2-диметилбутандііл, 2,3-диметилбутандііл та інші їм подібні.

Під терміном "фармацевтично прийнятні солі" мають на увазі фармацевтично прийнятні кислотні або основно-адитивні солі. Під фармацевтично прийнятними кислотно- або основно-адитивними солями, як зазначено вище, мають на увазі, що вони включають терапевтично активні нетоксичні форми кислотно-адитивної солі та нетоксичні форми основно-адитивної солі, які сполуки формули (I) здатні утворювати. Сполуки формули (I), які мають властивості основ, можуть бути перетворені в їх фармацевтично прийнятні кислотно-адитивні солі за допомогою обробки зазначеної основної форми відповідною кислотою. Придатні кислоти включають, наприклад, неорганічні кислоти, такі як галогенводневі кислоти, наприклад, хлористоводнева кислота або бромистоводнева кислота; сірчана кислота; азотна кислота, фосфорна кислота та інші кислоти; або органічні кислоти, такі як, наприклад, оцтова, пропіонова кислота, гідрооцтова кислота, молочна кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, малінова кислота, бурштинова кислота (тобто бутандіонова кислота), малеїнова кислота, фумарова кислота, яблучна кислота, виннокаменна кислота, лимонна кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота, бензолсульфонова кислота, п-толуолсульфонова кислота, цикламова кислота, саліцилова кислота, п-аміносалицилова кислота, павома кислота та інші їм подібні кислоти.

Сполуки формули (I) з кислотними властивостями можна перетворювати в їхні фармацевтично прийнятні основно-адитивні солі за допомогою обробки зазначеної кислотної форми відповідною органічною або неорганічною основою. Придатні форми основних солей включають, наприклад, солі амонію, солі лужних та лужноземельних металів, наприклад, солі літію, натрію, калію, магнію, кальцію та інші їм подібні, солі з органічними основами, наприклад, солі бензатину, N-метил-D-глюкаміну, гідрабаміну та солі з амінокислотами, такими як, наприклад, аргінін, лізин та інші їм подібні.

Терміни "кислотна" або "основна адитивна сіль" також включають гідрати та адитивні сольватні форми, які сполуки формули (I) здатні утворювати. Прикладами таких форм є, наприклад, гідрати, алкоголяти та інші їм подібні.

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 зазначено 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 сполук 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) мають 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-оксидовані.



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

Сполуки, наведені у EP 1036073, мають фундаментальні релаксуючі властивості 1-[1-[(2S)-2-[(2R)-3,4-дигідро-2H-1-бензопіран-2-ил]-2-гідроксиетил]-4-піперидиніл]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №9 в даному описі) розкрито у EP 1036073. Сполуки, наведені у EP 13612, являють собою антагонисти серотоніну Розкриті сполуки 1-[2-[4-(4-фторбензоїл)-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №10 в даному описі), 1-[3-[4-(4-фторбензоїл)-1-піперидиніл]пропіл]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №11 в даному описі), 3-[2-[4-(4-хлорбензоїл)-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №12 в даному описі), 3-[2-[4-(4-фторфеніл)гідроксиметил]-1-піперидиніл]етил]-2,4-(1H,3H)-хіназоліндіон (сполука №13 в даному описі).

Зненацька було виявлено, що сполуки за даним винаходом проявляють інгібуючу активність по відношенню до PARP.

Перша група з розглянутих сполук складається з таких сполук формули (I), де накладають одне або декілька наведених нижче обмежень:

a) кожний X незалежно позначає  або ;

b) кожний Y незалежно позначає  або ;

c) L¹ являє собою прямий зв'язок або двохвалентний радикал, обраний з -C₁₋₆алкандіїлу-;

d) L² являє собою прямий зв'язок або двохвалентний радикал, обраний з карбонілу, -C₁₋₆алкандіїлу-, -C₁₋₆алкандиїла-, -(гідрокси)C₁₋₆алкандіїлу- або -C(O)-C₁₋₆алкандіїлу-;

e) R¹ позначає атом водню або гідроксильну групу,

f) Z позначає атом водню або радикал, обраний з (a-1), (a-2), (a-3), (a-4) або (a-5);


g) кожний R² незалежно обрано з атома водню, атома галогену або C₁₋₆алкілу.


Другу групу сполук, що представляють інтерес, складають такі сполуки формули (I), до яких може бути застосовано одне або декілька з наступних обмежень:

a) L² позначає прямий зв'язок або двохвалентний радикал, обраний з -C₁₋₆алкандіїлу- або -C(O)-C₁₋₆алкандіїлу-;

b) Z позначає атом водню або радикал, обраний з (a-1), (a-4) або (a-5).

Третю групу сполук, що представляють інтерес, складають такі сполуки формули (I), до яких може бути застосовано одне або декілька з наступних обмежень:

a) кожний X позначає ;

b) кожний Y позначає ;





c) L¹ позначає прямий зв'язок;

d) L² позначає прямий зв'язок;

e) R¹ позначає атом водню;

f) Z позначає атом водню.



Група переважних сполук складається з таких сполук формули (I), де кожний X незалежно позначає

 або ; кожний Y незалежно позначає  або ; L¹ позначає прямий зв'язок або

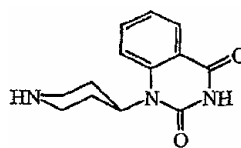
двовалентний радикал, обраний з -C₁₋₆алкандіїлу-, L² позначає прямий зв'язок або двовалентний радикал, обраний з -C₁₋₆алкандіїлу; R¹ позначає атом водню або гідроксильну групу;

Z позначає атом водню або радикал, обраний з (a-1), (a-2), (a-3), (a-4) або (a-5); та кожний R² незалежно обрано з атома водню, атома галогену або C₁₋₆алкілу.

Група більш переважних сполук складається з таких сполук формули (I), де кожний X позначає


; кожний Y позначає ; L¹ позначає прямий зв'язок; L² позначає прямий зв'язок; R¹ позначає атом водню; та Z позначає атом водню.

Найбільш переважною сполукою є сполука №1.

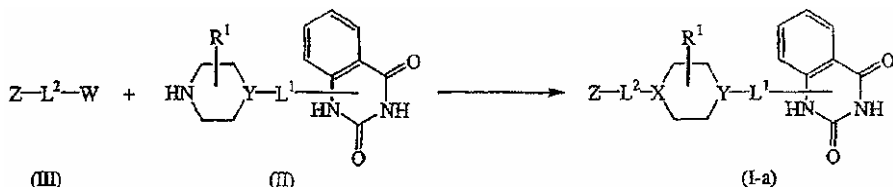



Сполука № 1

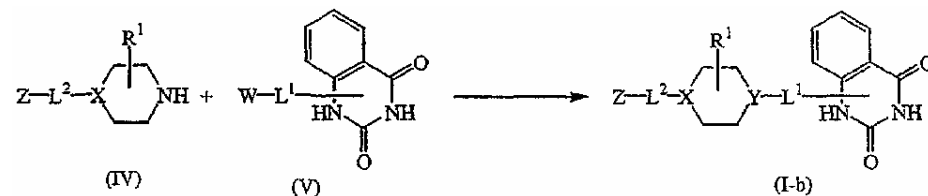
Сполуки формули (I) можуть бути отримані у відповідності зі способами, що несуть загальний характер, описаними в EP 1036073 та EP 13612. Вихідні речовини та деякі з похідних являють собою відомі сполуки та є комерційно доступними або можуть бути отримані відповідно до загальноприйнятих способів проведення 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 X позначає , які в описі даного винаходу відносяться до сполук формули (1-a), можуть бути отримані за допомогою взаємодії проміжної сполуки формули (II) з проміжною сполукою формули (III), де W позначає придатну кінцеву групу, таку як, наприклад, атом галогену, зокрема, атом фтору, хлору, броду або йоду, або сульфонілокси-радикал, такий як метилсульфонілокси група, 4-метилфенілсульфонілокси група та інші їм подібні. Реакцію можна проводити в інертному для даної реакції розчиннику, такому як, наприклад, спирт, зокрема, метанол, етанол, 2-метоксиетанол, пропанол, бутанол та інші їм подібні, простий ефір, зокрема, 4,4-діоксан, 1,1'-

оксибіспропан та інші їм подібні.; або кетон, зокрема, 4-метил-2-пентанон, N,N-диметилформамід, нітробензол та інші їм подібні. Для зв'язування кислоти, яка виділяється під час проведення реакції, можна використовувати додавання придатної основи, такої як, наприклад, карбонат або гідрокарбонат лужного або лужноземельного металу, зокрема, додавання триетиламіну або карбонату



Аналогічно сполуки формули (I), де Y позначає , які у даному описі відносяться до сполук формули (I-b), можуть бути отримані за допомогою



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 нітрилів 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 гідрогенізовані 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 рагр, 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.

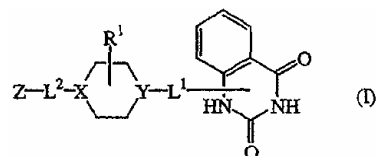
натрію. Для прискорення реакції може бути додана невелика кількість відповідного йодиду металу, зокрема, йодид натрію або калію. Швидкість реакції можна прискорити за допомогою перемішування. Реакцію звичайно можна проводити в інтервалі від кімнатної температури та до температури кипіння реакційної суміші та, якщо це необхідно, реакцію можна проводити при підвищеному тиску









взаємодії проміжної сполуки формули (IV) з проміжною сполукою формули (V), де визначення W вказано раніше.

Термін "PARP", включає, але не обмежується тільки ними, PARP-1. В обсяг значення цього терміна можуть бути включені PARP-2, PARP-3, Vault-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 танкіразу-2 можуть мати кращі властивості в тім відношенні, що вони мають посилену активність стосовно інгібування росту злоякісних клітин.

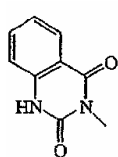
Даний винахід також включає застосування сполук для одержання лікарського засобу для лікування будь-якого захворювання та порушення у описаних тут тварин, де зазначені сполуки являють собою сполуки формули (I)



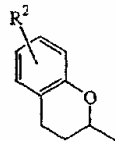
їхні N-оксидні форми, фармацевтично прийнятні адитивні солі та стереохімічно ізомерні форми, де кожний X незалежно позначає  або ; та коли X позначає , то Y позначає ; кожний Y незалежно позначає  або ; за винятком випадку, коли X позначає , та тоді Y позначає .

L^1 позначає прямий зв'язок або двовалентний радикал, обраний з $-C_{1-6}$ алкандіїлу-,

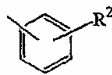
L^2 позначає прямий зв'язок або двовалентний радикал, обраний з карбонілу, $-C_{1-6}$ алкандіїлу-, $-(\text{гідрокси})C_{1-6}$ алкандіїлу-, $-C(O)-C_{1-6}$ алкандіїлу- або $-C_{1-6}$ алкандіїл- $C(O)-$;



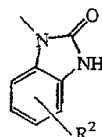
(a-1)



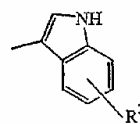
(a-2)



(a-3)



(a-4)



(a-5)

де кожний R^2 незалежно обрано з атома водню, атома галогену або C_{1-6} алкілу.

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, гліколі, 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 зм'ящують, 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 глюкози. 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

R^1 позначає атом водню або гідроксильну групу,

Z позначає атом водню або радикал, обраний з

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 деполяризацію 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 також 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 вилів, злоякісний плевральний вилів, меланома, мезотеліома, множина мієлома, 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 ппоксичних 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-бромдезоксипуридин (BUd), 5-йоддезоксипуридин (IUd), бромдезоксипуридин, фтордезоксипуридин (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, перфторвуглець (наприклад, флюосол 10 DA), 2,3-DPG, BW12C, блокатори кальцієвих каналів, пентоксифілін, антиангіогенні сполуки, гідралазин та LBSO. Приклади хемотерапевтичних засобів, які можуть використо-

уватися разом з радіосенсибілізаторами, включають, але не обмежуються тільки ними: адриаміцин, камптотецин, карбоплатин, цисплатин, даунорубіцин, доцетаксел, доксорубіцин, інтерферон (альфа, бета, гама), інтерлейкін-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.

Наступні нижче приклади ілюструють даний винахід.

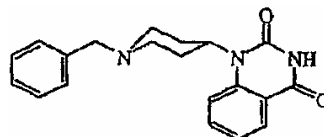
Експериментальна частина

Надалі в даному описі, "DCM" визначається як дихлорметан, "DIPE" визначається як діізопропіловий ефір, "ДМФА" визначається як N,N-диметилформамід, "EtOH" визначається як етанол, "EtOAc" визначається як етилацетат, "MeOH" визначається як метанол та "TEA" визначається як триетиламін, "ТГФ" визначається як тетрагідрофуран.

А. Одержання проміжних сполук

Приклад А1

Одержання проміжної сполуки 1

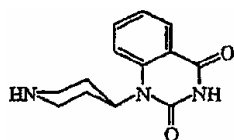


Суміш 2-[[1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]бензаміду (0,03моль) та 1,1'-карбонілбіс-1Н-імідазолу (0,033моль) у диметилацетаміді (25мл) нагрівали до кипіння зі зворотним холодильником при перемішуванні протягом 5 годин, потім додавали додаткову кількість 1,1'-карбонілбіс-1Н-імідазолу (0,003моль) та реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні та при нагріванні до кипіння зі зворотним холодильником. Суміш виливали у воду (300мл), осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою та DIPE та висушували (на виході отримали 9,1г, 91%). Частину продукту потім кристалізували із ДМФА та води, виділяли кінцевий продукт, отримуючи на виході 0,8г проміжної сполуки 1 з температурою плавлення 233,5°C.

В. Отримання кінцевих продуктів

Приклад В1

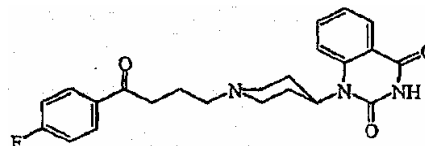
Отримання сполуки 1



Суміш проміжної сполуки 1 (0,15моль) у ТГФ (250мл) та MeOH (250мл) гідривали в апараті Парра над 10%-м Pd/C (5г) у якості каталізатора. Після поглинання H₂ (1еквів.) каталізатор відфільтровували та отримували фільтрат (I) та осад, що залишився на фільтрі. Отриманий осад перемішували у киплячому гідроксиацетоні та суміш фільтрували у гарячому вигляді. Отриманий фільтрат об'єднували із фільтратом (I) та суміш випарювали. Залишок перемішували у воді, потім додавали NH₄OH та суміш перемішували протягом 1 години разом із трихлорметаном. Осад відфільтровували та висушували, отримуючи на виході 31г (84%) сполуки 1, температура плавлення 253,7°C.

Приклад В2

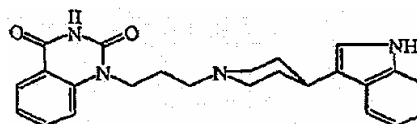
Отримання сполуки 2



Сполуку 1 (0,038моль) у 2-метоксиетанолі (150мл) перемішували при нагріванні до повного розчинення, потім по краплях при нагріванні додавали розчин 1-(4-фторфеніл)-4-йод-1-бутанону (0,019моль) у 2-метоксезтанолі (10мл), при цьому утворювався осад. Реакційну суміш нагрівали до кипіння зі зворотним холодильником при перемішуванні протягом 1,5 годин. Осад відфільтровували та фільтрат випарювали. Осад очищували за допомогою силікагелю через воронку зі скляним фільтруючим дном (елюент: CHCl₃/MeOH 90/10). Збирали фракції з продуктом та вилучали розчинник. Залишок кристалізували із 2-пропанолу, отриманий осад збирали та висушували, отримуючи на виході 2,3г (29%) сполуки 2, температура плавлення 195°C.

Приклад В3

Отримання сполуки 3

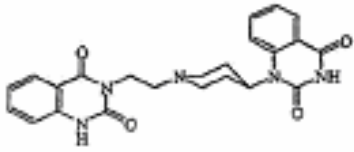
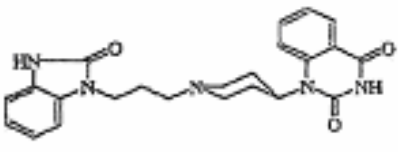
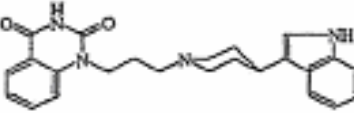
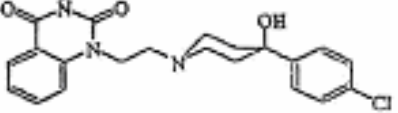
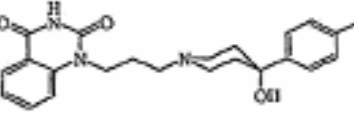
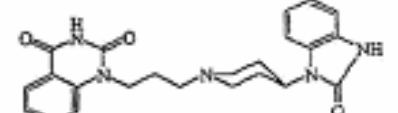
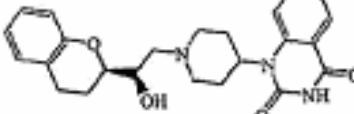
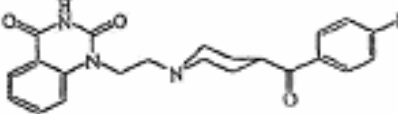
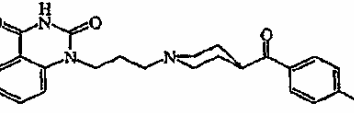
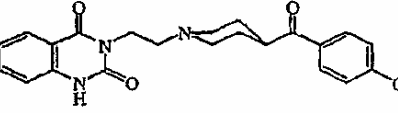
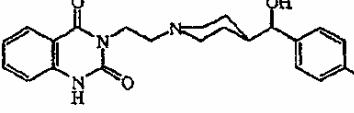


Суміш 1-(3-хлорпропіл)-2,4(1Н,3Н)-хіназоліндіону (0,015моль), 3-(4-піперидиніл)-1Н-індолу (0,015моль) та карбонату натрію (0,030моль) у 4-метил-2-пентаноні (150мл) нагрівали до кипіння зі зворотним холодильником при перемішуванні протягом 24 годин, потім реакційну суміш охолоджували та додавали воду. Відділяли органічний шар, висушували та вилучали розчинник. Залишок очищували за допомогою колоночної хроматографії на силікагелі (елюент: CHCl₃/MeOH 95/5). Збирали фракції з продуктом та вилучали розчинник. Залишок кристалізували із EtOH та збирали отриманий осад, отримуючи на виході 2г (33%) сполуки 3, температура плавлення 216,8°C.

У Таблиці 1 наведені сполуки, які отримують у відповідності з одним із наведених вище прикладів.

Таблиця 1

<p>Сполука № 1, Приклад [В1], температура плавлення 253,7° С</p>	<p>Сполука № 2, Приклад [В2], температура плавлення 195° С</p>

	
Сполука № 4; Приклад [B1] температура плавлення 266,6° C	Сполука № 5, Приклад [B1], температура плавлення 222,2° C
	
Сполука № 3; Приклад [B3], температура плавлення 216,8° C	.HCl (1 1) H ₂ O (1 1) Сполука № 6, Приклад [B3], температура плавлення 212,6° C
	
Сполука № 7, Приклад [B3], температура плавлення 186,3° C	HCl (1 1) H ₂ O (2 1), Сполука № 8, Приклад [B3], температура плавлення > 260° C
	
Сполука № 9, WO 99/29687	Сполука № 10, температура плавлення 219,7° C, EP 13612
	
Сполука № 11, температура плавлення 192,9° C, EP 13612	Сполука № 12, EP 13612
	
Сполука № 13, EP 13612	

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 загально-прийнятому методі SPA для визначення поліАДФ-рибозилування біотинільованих білків-мішеней, тобто пістонів. Це рибозилування індуюють, використовуючи фермент PARP-1, активований ДНК із одноланцюговими розривами, та [³H]-

нікотинамідадениндинуклеотидом ($[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$) як донором АДФ-рибозилів.

В якості індуктора активності ферменту PARP-1, одержували ДНК із одностандартними розривами. Для цього 25мг ДНК (постачальник Sigma) розчиняли в 25мл буферу для ДНК (10мМ Tris-HCl, pH 7,4, 0,5мг/мл бичачі сироваткові альбуміни (BSA), 5мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 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) біотинілювали з використанням набору для біотинілювання 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 $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$ отримували при додаванні 120мкл $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$ (0,1мКи/мл, постачальник: NEN) до 6мл буферу для інкубації (50мМ Tris/HCl, pH 8; 0,2мМ DTT; 4мМ MgCl_2). 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. Біотинілювані 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 одностандартними 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 $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$ на одну лунку. Кінцеві концентрації в інкубаційній суміші складали 2мкг/мл для біотинілюваних гістонів 2мг/мл для гранул PVT-SPA, 2мкг/мл для ДНК із одностандартними 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 (утри-

муючі 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^{-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 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 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, які тестувалися, представлені у вигляді pIC_{50} (значення негативного логарифма значення IC_{50}). Для перевірки аналізу SPA як контрольні сполуки використовували 4-аміно-1,8-нафталімід. Сполуки, які тестували, показували інгібіторну активність при початковій досліджуваній концентрації 10^{-5}М (див. таблицю 2).

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

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

Отримували суміш гістонів (вихідний розчин: 5мг/мл в H_2O), NAD^+ (вихідний розчин: 100мМ в H_2O), та $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ у буфері для інкубації (50мМ Tris/HCl, pH 8; 0,2мМ DTT; 4мМ MgCl_2). Також одержували суміш ферменту PARP-1 (5-10мкг/мл) та ДНК із одностандартними розривами. ДНК із одностандартними 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^+ , 200мкМ (0,5мкКи) для $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ та 2мкг/мл для ДНК із одностандартними 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 $[^3H]$ -нікотинамідаденіндіуклеотиду ($[^3H]$ -NAD⁺) як донор АДФ-рибозилів.

Вихідний розчин $[^3H]$ -NAD⁺/NAD одержували за допомогою додавання 64,6мкл $[^3H]$ -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, р 7,4; 0,9мМ DTT; 6мМ MgCl₂). Фермент TANK-2 одержували, як описано в EP 1238063. 60мкл буфера для аналізу разом з 1мкл сполуки в ДМСО, 20мкл $[^3H]$ -NAD⁺/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 H₂O). 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 контролі (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. У даному 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	6,333	6,691	<5
2	5,804	6,59	<5
3	5,988	6,867	<5
4	5,642	6,257	5,158
5	5,759	6,458	5,121
6	5,877	6,778	5,86
7	5,49	6,535	<5
8	5,792	6,848	5,247
9	5,661	6,445	<5
10	5,745	6,658	5,143
11	5,566	6,655	<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*.