



УКРАЇНА

(19) UA (11) 97494 (13) C2

(51) МПК (2012.01)
C07D 237/32 (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01)
A61P 35/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОХІДНЕ ФТАЛАЗИНОНУ

1

(21) а200904210
(22) 15.10.2007
(24) 27.02.2012
(86) PCT/GB2007/003888, 15.10.2007
(31) 60/829,694
(32) 17.10.2006
(33) US
(46) 27.02.2012, Бюл.№ 4, 2012 р.
(72) МІНЕР КЕЙТ АЛЛАН, GB, ОТТРИДЖ ЕНТОНИ ПІТЕР, GB, ЛОНЗБОРО ДЕРЕК ДЖОН, GB, ХАЛЛЕТТ МАЙКЛ РАЙМОНД, GB, МАЛЛХОЛЛЕНД КЕЙТ РАЙМОНД, GB, ПІТТАМ ДЖОН ДЕВІД, GB, ЛАФФАН ДЕВІД ДЕРМОТ ПАТРІК, GB, АШУЕРТ ІАН ВУДВАРД, GB, ДЖОУНЗ МАРТІН ФРЕНСІС, GB, ЧЕРРІМАН ДЖАНЕТТ ХЕЛЕН, GB
(73) КУДОС ФАРМАС'ЮТІКАЛЗ ЛІМІТЕД, GB
(56) WO 2004/080976 A; 23.09.2004
(57) 1. 4-[3-(4-Циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторобензил]-2Н-фталазин-1-он як кристалічна форма А.

2. Сполука за п. 1, що має наступні характерні піки на дифракційній рентгенограмі порошку:

Пік	$2\theta^{\circ}(\pm 0,1^{\circ}) (\lambda=1,5418\text{\AA})$
1	12,0
2	17,8
3	21,1
4	22,3
5	29,2

3. Сполука за п. 1, що має наступні характерні піки на дифракційній рентгенограмі порошку:

Пік	$2\theta^{\circ}(\pm 0,1^{\circ}) (\lambda=1,5418\text{\AA})$
1	12,0
2	17,8
3	21,1
4	22,3
5	29,2
6	10,5
7	14,0
8	21,7
9	24,3
10	26,1

4. Сполука за будь-яким з пп. 1-3, яка відрізняється тим, що починає плавитися при $210,1\pm 1^{\circ}\text{C}$

2

при нагріванні від 25 до 325°C зі швидкістю 10°C за хвилину у ДСК.

5. Спосіб одержання 4-[3-(4-циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2Н-фталазин-1-ону (сполуки А) як кристалічної форми А, в якому здійснюють стадії:

i) кристалізація 4-[3-(4-циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторобензил]-2Н-фталазин-1-ону з розчинника;

(ii) якщо первісний розчинник не етанол, то кристалічну сполуку А обробляють етанолом;

(iii) обробка кристалічної сполуки А водою з метою видалення захопленого етанолу;

(iv) сушіння кінцевого продукту.

6. Спосіб одержання 4-[3-(4-циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2Н-фталазин-1-ону (сполуки А) як кристалічної форми А, в якому здійснюють стадії:

(i) кристалізація 4-[3-(4-циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторобензил]-2Н-фталазин-1-ону з розчинника;

(ii) якщо первісний розчинник, що використовувався у синтезі сполуки А у кристалічній формі, не є сумішшю води і C_{1-2} спирту, то сполуку А нагрівають із сумішшю води і C_{1-2} спирту;

(iii) перегонка сполуки при тиску навколишнього середовища; і

(iv) сушіння кінцевого продукту.

7. Спосіб одержання 4-[3-(4-циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2Н-фталазин-1-ону (сполуки А) як кристалічної форми А, в якому здійснюють стадії:

(i) суспензування сполуки А у суміші води і C_{1-2} спирту як розчиннику;

(ii) нагрівання суспензії зі зворотним холодильником;

(iii) охолодження розчину і кристалізація сполуки А у вигляді форми А;

(iv) сушіння кінцевого продукту.

8. Спосіб одержання 4-[3-(4-циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2Н-фталазин-1-ону з 4-[4-фторо-3-(піперазин-1-карбоніл)-бензил]-2Н-фталазин-1-ону, в якому здійснюють стадії:

(i) контрольоване додавання заздалегідь виготовленого розчину триетиламіну та хлориду циклоп-

(13) C2

(11) 97494

(19) UA

ропанкарбонілу в органічному розчиннику до 4-[4-фторо-3-(піперазин-1-карбоніл)-бензил]-2Н-фталазин-1-ону в тому ж органічному розчиннику, контролюючи, щоб температура розчину була нижче 20 °С.

9. Спосіб одержання 4-[3-(4-циклопропанкарбонілпіперазин-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2Н-фталазин-1-ону з 2-фторо-5-(4-оксо-3,4-дигідрофталазин-1-ілметил)-бензойної кислоти, в якому здійснюють реакцію 2-фторо-5-(4-оксо-3,4-дигідрофталазин-1-ілметил)-бензойної кислоти з 1-(циклопропілкарбоніл)піперазином або з його сіллю мінеральної кислоти у присутності амідного зшиваючого агента.

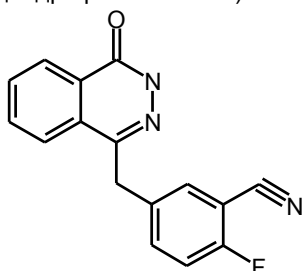
10. Спосіб одержання 2-фторо-5-(4-оксо-3,4-дигідрофталазин-1-ілметил)-бензойної кислоти, в якому здійснюють стадії:

(a) синтезування діетил(3-оксо-1,3-дигідро-2-бензофуран-1-іл)фосфонату з 2-карбоксибензальдегіду;

(b) синтезування 2-фторо-5-[(E/Z)-(3-оксо-2-бензофуран-1(3Н)-іліден)метил]бензонітрилу з діетил(3-оксо-1,3-дигідро-2-бензофуран-1-іл)фосфонату.

11. Спосіб за п. 10, в якому здійснюють додатково стадію:

(c) синтезування 2-фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазин-1-іл)метил]бензонітрилу (ED):

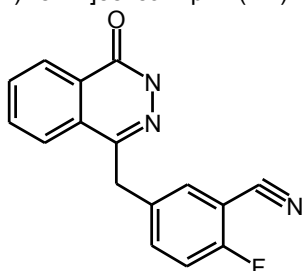


ED

зі сполуки E реакцію з гідразингідратом; і

(d) синтезування сполуки D зі сполуки ED реакцією з гідроксидом натрію.

12. 2-Фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазин-1-іл)метил]бензонітрил (ED):



ED

13. Фармацевтична композиція, що містить сполуку згідно з будь-яким з пп. 1-4 та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

14. Сполука згідно з будь-яким з пп. 1-4, яка **відрізняється** тим, що її використовують у способі лікування тіла людини або тварини.

15. Сполука згідно з будь-яким з пп. 1-4, яка **відрізняється** тим, що її використовують у способі інгібування PARP для лікування тіла людини або тварини.

16. Застосування сполуки згідно з будь-яким з пп. 1-4 для виробництва ліків для інгібування діяльності PARP.

17. Застосування сполуки згідно з будь-яким з пп. 1-4 для виробництва ліків для лікування: хвороб судин; септичного шоку, ішемічного ураження, нейротоксичності; геморагічного шоку; вірусної інфекції або хвороб, що лікуються інгібуванням діяльності PARP.

18. Застосування сполуки згідно з будь-яким з пп. 1-4 для виробництва ліків для використання як допоміжних засобів при терапії раку або для потенціювання клітин пухлини з метою подальшого лікування іонізуючими випромінюванням або хіміотерапією.

19. Застосування сполуки згідно з будь-яким з пп. 1-4 для виробництва ліків для використання при лікуванні раку у індивідуума, де зазначений рак з недостатньою ГР, що залежить від шляху репарації DSB ДНК.

20. Застосування згідно з п. 19, де рак включає одну або декілька клітин раку, які мають меншу або зовсім позбавлені здатності відновлювати ДНК DSB шляхом ГР, що притаманний нормальним клітинам.

21. Застосування згідно з п. 20, де клітини раку мають BRCA1 або BRCA2 дефіцитний фенотип.

22. Застосування згідно з п. 21, де клітини раку є BRCA1 або BRCA2 дефіцитними.

23. Застосування згідно з будь-яким з пп. 19-22, де індивідуум є гетерозиготним відносно мутації гена, що кодує складову ГР, що залежить від шляху репарації DSB ДНК.

24. Застосування згідно з п. 23, де індивідуум є гетерозиготним відносно мутації у BRCA1 та/або BRCA2.

25. Застосування згідно з будь-яким з пп. 19-24, де зазначений рак є раком молочної залози, яєчника, простати або підшлункової залози.

26. Застосування згідно з будь-яким з пп. 19-25, де лікування додатково включає призначення іонізаційного опромінювання або хіміотерапії.

Даний винахід відноситься до кристалічної форми та покращеного способу синтезу специфічного похідного фталазінону, проміжних сполук да-

ного синтезу і фармацевтичних композицій та використання кристалічної форми.

Фермент ссавців PARP (113-kDa мультидоменний білок) залучається при передачі сигналів

пошкодження ДНК через його здатність розпізнати і швидко зв'язувати одно або двониткові розриви ДНК (D'Amours, et al., *Biochem. J.*, 342, 249-268 (1999)).

Результати декількох дослідів привели до висновку що PARP бере участь в ряді функцій, що пов'язані з ДНК, зокрема у ампліфікації гену, поділу клітин, диференціації, апоптозі, ексцизійній репарації основи ДНК а також впливає на довжину теломеру і стабільність хромосоми (d'Adda di Fagagna, et al., *Nature Gen.*, 23(1), 76-80 (1999)).

Вчення про механізм, за яким PARP модулює репарацію ДНК та інші процеси, висвітлює його важливість при утворенні полі (АДФ рибоза) ланцюгів в межах ядра клітини (Althaus, F.R. and Richter, C, *АДП-рибосилація of Proteins: Enzymology and Biological Significance*, Springer-Verlag, Berlin (1987)). ДНК зв'язок, активований PARP, задіює НАД для синтезу різноманітних цільових білків полі (АДФ рибози) ядра, зокрема топоізомерази, гістони і безпосередньо PARP, (Rhun, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 1-10 (1998)).

Полі(АДП-рибосил)ація також пов'язана із злоякісною трансформацією. Наприклад, активність PARP вища в ізолюваних ядрах SV40-трансформованих фібробластів, тоді як лейкоцитні клітини та клітини колоректального раку, проявляють вищу активність ензиму ніж еквівалентні нормальні лейкоцити і клітини слизової оболонки товстої кишки (Miwa, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 181, 313-321 (1977); Burzio, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149, 933-938 (1975); and Hirai, et al., *Cancer Res.*, 43, 3441-3446 (1983)).

Ряд низько-молекулярних інгібіторів PARP були використані, щоб встановити функціональну роль полі(АДП-рибосил)ації у репарації ДНК. У клітинах, що оброблялися алкілюючими речовинами, інгібування PARP призводило до вираженого збільшення випадків розриву ниток ДНК і загибелі кліток (Durkacz, et al., *Nature*, 283, 593-596 (1980); Berger, N.A., *Radiation Research*, 101, 4-14 (1985)).

Згодом, було виявлено, що такі інгібітори збільшують ефективність опромінення, пригнічуючи репарацію потенційно смертельного пошкодження (Ben-Hur, et al., *British Journal of Cancer*, 49 (Suppl. VI), 34-42 (1984); Schlicker, et al., *Int. J. Radial. Biol.*, 75, 91-100 (1999)). Інгібітори PARP також виявилися ефективними у випадку радіо чутливих гіпоксичних клітин пухлини (US 5,032,617; US 5,215,738 and US 5,041,653).

До того ж, PARP нокаутних тварин (PARP -/-) проявляють нестабільність геному у відповідь на дію алкілюючих речовин і γ-опромінення (Wang, et al., *Genes Dev.*, 9, 509-520 (1995); Menissier de Murcia, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7303-7307 (1997)).

Роль PARP також була продемонстрована при певних судинних хворобах, септичному шоці, ішемічному ураженні і нейротоксичності (Cantoni, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1014, 1-7 (1989); Szabo, et al., *J. Clin. Invest.*, 100, 723-735 (1997)). Пошкодження ДНК кисневими радикалами, яке призводить до розривів ниток ДНК, які згодом визначаються PARP, - є головним чинником, що сприяє на стадіях захворювання, які виявлені при дослі-

дження інгібіторів PARP (Cosi, et al., *J. Neurosci. Res.*, 39, 38-46 (1994); Said, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 4688-4692 (1996)). Нещодавно, була продемонстрована роль PARP у патогенезі геморагічного шоку (Liaudet, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(3), 10203-10208 (2000)).

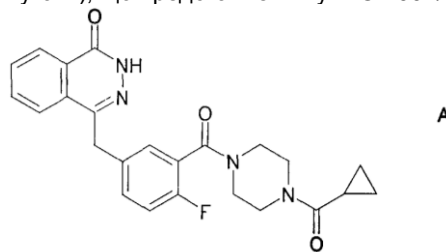
Також продемонстровано, що інгібітори PARP ефективні щодо ретровірусної інфекції клітин ссавців. Таке інгібування рекомбінантного ретровірусного вектору інфекцій відбувається в різних типах клітинах (Gaken, et al., *J. Virology*, 70(6), 3992-4000 (1996)). Тому інгібітори PARP почали використовувати при анти-вірусних терапіях і лікуванні раку (WO 91/18591).

Крім того, було припущення, що інгібітори PARP призупиняли початок характеристик старіння в фібробластах людини (Rattan and Clark, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201(2), 665-672 (1994)), що може бути подібним до ролі, яку PARP грає при контролюванні функції теломеру (d'Adda di Fagagna, et al., *Nature Gen.*, 23(1), 76-80 (1999)).

WO 2004/080976 представляє ряд похідних фталазінону, їх активність при інгібуванні PARP, і витікаюче з цього використання цих сполук для лікування раку або застосування їх разом з іонізуючим опроміненням або хіміотерапією, або як самостійного агенту.

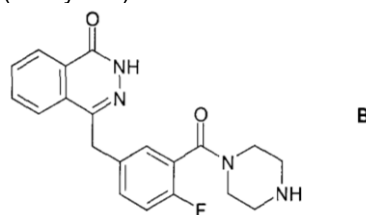
WO 2005/053662 описує використання інгібіторів PARP, зокрема похідних фталазінону, як інгібіторів ексцизійної репарації основи (BER). Використання цих інгібіторів у виробництві ліків для лікування раку при недостатній гомологічній рекомбінації (ГР), що залежить від ДНК DSB репараційної активності, зокрема у випадках раку, які мають BRCA1 та/або BRCA2 дефіцитний фенотип.

4-[3-(4-циклопропанкарбоніл-піперазин-1-карбоніл)-4-фторобензил]-2Н-фталазін-1-он (сполука А), що представлений у WO 2004/080976:

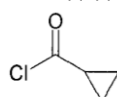


є особливо цікавим.

У WO 2004/080976 сполука А була синтезована, як одна з ряду бібліотеки сполук 4-[4-фторо-3-(піперазин-1-карбоніл)-бензил]-2Н-фталазін-1-он (сполука В):

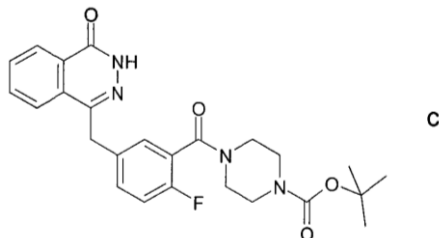


з додаванням циклопропанкарбоніл хлориду:



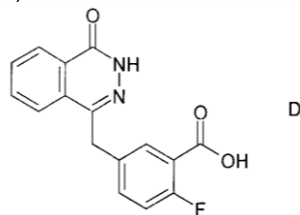
до розчину (В) у дихлорметані, а потім основи Hünig's (амін N,N-діізопропілети́л). Ця реакція проходить при перемішуванні за кімнатної температури протягом 16 годин, а отримана сполука, очищається препаративною ВЕРХ.

Похідне піперазину (В) отримували знімаючи захист з трет-бутилового ефіру 4-[2-фторо-5-(4-оксо-3,4-дигідро-фталазін-1-ілметил)-бензоїл]-піперазин-1-карбоксильної кислоти (сполука С):

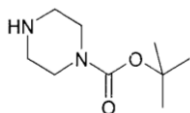


шляхом реакції з 6М HCl та етанолом протягом 1 години, нейтралізації аміаком до pH 9, і екстракції дихлорметаном.

Трет-бутокси захищене похідне піперазину (С) синтезували з 2-фторо-5-(4-оксо-3,4-дигідро-фталазін-1-ілметил)-бензойної кислоти (сполука D):



додаючи трет-бутильний ефір піперазин-1-карбокси кислоти:



2-(1H-бензотріазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилураніл гексафторфосфат (НВТУ) та N,N-діізопропілети́ламін у диметилацетаміді при перемішуванні протягом 18 годин.

Окремі форми сполуки А можуть мати корисні властивості такі як, наприклад, розчинність та/або стабільність та/або біологічна доступність та/або профіль розподілення домішок та/або фільтраційні якості та/або характеристики сушіння та/або недостатня гігроскопічність, та/або легкість обробки та/або тонкого подрібнення та/або формування у таблетки. Також бажано розробити вдосконалений спосіб синтезу, який давав би змогу синтезувати сполуки у мультиграмових кількостях.

Відповідно, перше втілення даного винаходу стосується 4-[3-(4-циклопропанкарбоніл-піперазин-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2H-фталазін-1-ону (сполуки А) головним чином у кристалічній формі, зокрема у Формі А.

"Головним чином у кристалічній формі", як зазначено вище, означає, що як мінімум 50% від загальної ваги речовини знаходиться у кристалічній формі, бажано як мінімум 70% від загальної ваги, 80% або 90% від загальної ваги речовини. У деяких втіленнях, як мінімум 95% від загальної

ваги, 99% від загальної ваги або навіть 99.5% та більше від загальної ваги речовини може знаходитися у кристалічній формі.

Сполука А у кристалічній формі А має дифракційну рентгенограму ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) з характерними піками:

Пік	$2\theta^\circ (\pm 0.1^\circ)$
1	12.0
2	17.8
3	21.1
4	22.3
5	29.2

Сполука А у кристалічній формі А також може мати додаткові піки на дифракційній рентгенограмі ($\lambda=1.5418\text{\AA}$):

Пік	$2\theta^\circ (\pm 0.1^\circ)$
6	10.5
7	14.0
8	21.7
9	24.3
10	26.1

Сполука А у кристалічній формі А також може характеризуватися будь-якою комбінацією трьох або більше піків зі списку 10 піків представлених вище.

Зразок дифракційної рентгенограми порошку сполуки А представлений на Фігурі 3.

Сполука А легко може формувати структуру, в якій молекули розчинника можуть займати положення в межах кристалічної ґратки. Такі сольвати, не обов'язково стехіометричні за природою, можуть складатися з одного чистого сольвату (наприклад метаноляту сполуки А, і тетрагідрофуранату сполуки А) або також можуть складатися з більш ніж одного розчинника (наприклад метанол і діетиловий ефір). Молекули розчинника зазвичай розміщуються в межах порожнин, що створюють молекули сполуки А. За певних обставин, об'єм цих порожнин достатньо гнучкий, щоб включити ряд розчинників, що призводить до незначної зміни у загальній структурі речовини, і, як наслідок, до незначних зсувів у дифракційній рентгенограмі.

Сольвати, зокрема ті, які мають таку ж загальну структуру, є результатом дозрівання розчину і кристалізації з дихлорметану, етилацетату, метанолу, етанолу, ізопропанолу, 2-бутанолу, трет-бутил метилового ефіру, толуол, тетрагідрофурану, води, циклогексану, циклопропіл метилового кетону, 1,2-дихлоретану, етил трифторацетату, фторбензогексафторо-ізопропанолу, нонафторбутил метилового ефіру, 2-метил-1-пропанолу, нітрометану, пропіонітрилу, трихлоретилену, α,α,α -трифтортолуолу, гептану, діоксану, ацетонітрилу, або з чистих розчинників або у поєднанні з іншим розчинником. Дифракційна рентгенограма найпоширенішої структури сольвату представлена на Фігурі 4, і зазвичай містить найінтенсивніші піки в положеннях, які наводяться у списку нижче:

Пік	$2\theta^{\circ}(\pm 0.1^{\circ}) (\lambda = 1.5418 \text{ \AA})$
1	7.0-7.5
2	10.1-10.6
3	15.1-15.6
4	18.5-19.0
5	21.0-21.5
6	24.8-25.3
7	27.0-27.5

Такі результати можна пояснити так, що відносні інтенсивності піків, які наведені у фігурах, можуть змінюватися залежно від положення зразку під час аналізу та від типу і настройок приладу, який використовується, таким чином криві дифракційної рентгенограми, що наводяться у фігурах, є ілюстративними і не призначені для того, щоб використовуватися для порівняння абсолютних величин.

Форма А сполуки А головним чином не містить розчинник. Термін "головним чином не містить розчинник", означає, що форма може містити у своєму складі тільки незначні кількості будь-якого розчинника, наприклад, форма може містити 0.5 або менше відсотків від загальної ваги речовини будь-якого розчинника. Загалом будь-який розчинник, в тому числі вода, може складати 0.25%, 0.1%, 0.05% або 0.025% від загальної ваги речовини або менше.

Форма А сполуки А, може також описуватися за допомогою диференціальної скануючої калориметрії (ДСК). Форма А сполуки А при нагріванні від 25°C до 325°C з підвищенням температури на 10°C за хвилину починає плавитися при 210.1 °C $\pm 1^{\circ}\text{C}$. ДСК криві форми А сполуки А представлені на Фігурі 5.

Друге втілення даного винаходу представляє спосіб одержання 4-[3-(4-циклопропанкарбоніл-піперазин-1-карбоніл)-4-фтор-бензил]-2Н-фталазин-1-ону (сполуки А) у вигляді кристалічної форми А, що включає кристалізацію сполуки А з розчиннику з подальшим видаленням розчиннику з кристалічної форми за допомогою витіснювального агента. Витіснювальний агент може являти собою воду або суміш C_{1-2} спирту і води.

У першому втіленні, цей спосіб включає наступні стадії:

(i) кристалізація 4-[3-(4-циклопропанкарбоніл-піперазин-1-карбоніл)-4-фтор-бензил]-2Н-фталазин-1-ону (сполуки А) з розчиннику;

(ii) якщо первісний розчинник не етанол, то оброблення кристалічної сполуки А етанолом;

(iii) оброблення кристалічної сполуки А водою з метою видалення захопленого етанолу;

(iv) сушіння кінцевого продукту.

Розчинник, який використовується при первісній кристалізації, може бути, наприклад, дихлорметаном або ацетонітрилом.

Способи одержання форми А загалом можуть включати заміну розчиннику. Було встановлено, що сполука А кристалізується таким чином, що у кристалічній решітці утворюються порожнини куди можуть заходити розчинники, які потім важко видалити.

Спосіб згідно першого втілення може використовуватися зокрема, якщо розчинник, що викорис-

товувався при кристалізації сполуки А-дихлорметан. Стадія обміну дихлорметану на етанол може полягати у перегонці розчину сполуки А при атмосферному тиску за наявності етанолу. Обмін закінчено коли температура парів наближається до точки кипіння етанолу, наприклад як мінімум 73°C. Зокрема, обмін можна проводити шляхом відгонки більшості дихлорметану, а потім додавати певний об'єм етанолу. Потім продовжують перегонку замінюючи парції дистиляту на рівні за об'ємом кількості етанолу.

Кристалізацію сполуки А з етанолу можна проводити охолоджуючи розчин до температури 15°C та нижче, бажано до 10°C та нижче, і найбажаніше до близько 8°C. Після чого кристали сполуки А можна відфільтрувати.

Кристалічну сполуку А можна обробити водою для видалення захопленого етанолу шляхом суспензування кристалічної речовини у воді з подальшим нагріванням зі зворотним холодильником протягом достатнього часу, наприклад як мінімум трьох годин, бажаніше протягом близько чотирьох годин. Кристалічну сполуку А можна виділити з водної суспензії фільтрацією.

Після проведення описаних вище стадій, кінцевий продукт сушать. Наприклад, нагріваючи його у сушильній шафі при температурі як мінімум 60°C, бажано при близько 70°C.

У іншому втіленні спосіб включає стадії:

(i) одержання сполуки А у кристалічній формі, що містить розчинник;

(ii) якщо первісний розчинник, що використовувався у синтезі сполуки А у кристалічній формі не є сумішшю води і C_{1-2} спирту (метанол, етанол), то сполуку А у кристалічній формі обробляють сумішшю води і C_{1-2} спирту;

(iii) сушіння кінцевого продукту.

Далі кінцевий продукт можна обробляти сумішшю води і C_{1-2} спирту і сушити, щоб виділити сполуку А у кристалічній формі А.

Об'ємне співвідношення води і C_{1-2} спирту у суміші, якій відають особливу перевагу, має становити від 2:1 до 1:2, бажаніше від 1.5:1 до 1:1.5. Суміш, якій надають перевагу, складається з 1 частини води та 1.2 частин C_{1-2} спирту. Інша суміш, якій відають особливу перевагу, складається з 2 частин води та 1 частини C_{1-2} спирту. C_{1-2} спирт бажано являє собою етанол.

Сполуку А у кристалічній формі, можна одержати кристалізацією сполуки А з розчинника, як описано вище.

Обробку розчинником на стадії (ii) можна проводити суспензуванням сполуки А у суміші води і C_{1-2} спирту і нагріванням зі зворотним холодильником та при перемішуванні. Після чого суміш можна охолодити до приблизно 55 - 65°C і фільтрувати, наприклад крізь целітний фільтр. Фільтр можна промити сумішшю води і C_{1-2} спирту перед перегонкою при атмосферному тиску (зазвичай 1 атм) або вище. Перегонку можна зупинити до утворення суспензії, яку залишають при кімнатній температурі до подальшої фільтрації. Кінцевий відфільтрований осад можна промити водою.

Після проведення описаних вище стадій, кінцевий продукт сушать. Наприклад, нагріваючи

його у сушильній шафі при температурі як мінімум 50°C, бажано при близько 60°C.

Подальшу обробку можна проводити згідно способу як описано вище.

Згідно третього втілення спосіб включає:

(i) суспензування сполуки А у суміші води і C_{1-2} спирту як розчиннику;

(ii) нагрівання суспензії зі зворотним холодильником;

(iii) охолодження розчину і кристалізацію сполуки А у формі А;

(iv) сушіння кінцевого продукту.

Кінцевий продукт можна далі обробляти сумішшю води і C_{1-2} спирту і сушити, щоб виділити сполуку А у кристалічній формі А.

Об'ємне співвідношення води і C_{1-2} спирту у суміші, якій надають особливу перевагу, має становити від 2:1 до 1:5, бажаніше від 1:2 до 1:4. Бажано, щоб суміш складалася з 1 частини води та 3 частин C_{1-2} спирту. C_{1-2} спирт бажано являє собою етанол.

Стадія (iii) може включати охолодження розчину до температури приблизно 65 - 75°C (наприклад 70°C) і фільтрування, наприклад через целітний фільтр. Фільтр можна промити сумішшю води і C_{1-2} спирту перед перегонкою при атмосферному тиску (зазвичай 1 атм) або вище. Кристалізація може мати місце після охолодження кінцевого фільтрату до температури 40 - 50°C (наприклад 45°C). Утворену суспензію можна охолоджувати до температури навколишнього середовища (наприклад 20°C) протягом 2 - 3 години (наприклад 2.5 годин) і витримувати при даній температурі до повного завершення кристалізації, що може тривати від 12 до 24 годин, зазвичай близько 16 годин. Після завершення цієї стадії можна додати наступну порцію води. Кількість води може дорівнювати загальному об'єму наявного розчинника (вода і C_{1-2} спирт) і може додаватися повільно, наприклад протягом від 4 до 6 годин (наприклад 5). Суспензію можна витримувати після додавання води при температурі навколишнього середовища, наприклад, протягом 2 годин.

Потім суспензію можна фільтрувати, кінцевий відфільтрований осад можна промити сумішшю C_{1-2} спирту і води (у співвідношенні від 1:3 до 1:2, наприклад 1:2.3).

Після проведення описаних вище стадій, кінцевий продукт сушать. Наприклад, нагріваючи його у сушильній шафі у вакуумі при температурі від 40 до 60°C.

Третє втілення даного винаходу представляє спосіб синтезу сполуки А зі сполуки В, що включає стадії:

(i) контрольоване додавання заздалегідь виготовленого розчину триетиламіну та циклопропан карбоніл хлориду у відповідному органічному розчиннику (наприклад, ДХМ (дихлорметан)), до сполуки В у тому ж органічному розчиннику, контролюючи, щоб температура розчину була нижче 20°C. У деяких втіленнях, спосіб крім того включає стадію:

(ii) перемішування (наприклад, збовтування) утвореного на стадії (i) розчину до завершення реакції, підтримуючи температуру розчину нижче 20°C.

Додавати розчин на стадії (i) можна по краплинах.

Цей спосіб передбачає більший контроль реакції, ніж той, який описано у WO 2004/080976, що полягає у більш регіоселективному додаванні хлорангідриду. Використання менш контрольованого способу, який відомий з рівня техніки, може приводити до необхідності додавати азот та/або кисень до хлорангідрид у фталазіноні, так само як і азот до бажаного піперидину.

Бажаніше, вище наведений спосіб проводити у атмосфері азоту.

Також краще, щоб температура розчину на стадії (ii) підтримувалася в межах 10 - 15°C.

Продукт вище описаної реакції бажано як мінімум один раз промивати водою. Бажаніше, щоб виділення продукту реакції включало початкову та завершальну промивку водою та проміжні стадії промивки з використанням розбавленої кислоти, наприклад 5% розчину лимонної кислоти, після чого промивають розбавленою основою, наприклад 5% розчином карбонату натрію.

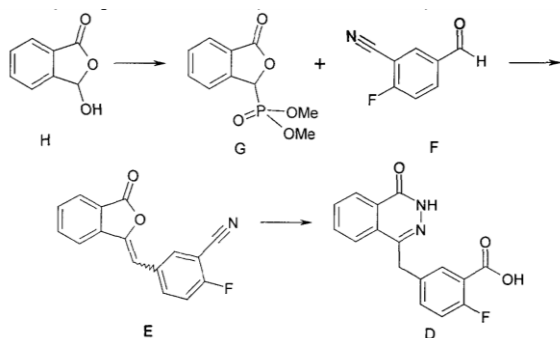
Четверте втілення даного винаходу представляє спосіб синтезу сполуки А зі сполуки D, що включає реакцію сполуки D з 1-(циклопропілкарбоніл)піперазином або його сіллю мінеральної кислоти, у присутності амідного зшиваючого агента та основи, наприклад, аміну (наприклад третинного аміну, зокрема діізопропілетиламіну).

Сіль мінеральної кислоти може бути, наприклад, сіллю соляної кислоти.

Додавання 1-(циклопропілкарбоніл)піперазину або його солі мінеральної кислоти до сполуки D може проходити у будь-якому відповідному розчиннику, наприклад, ацетонітрилі. Амідний зшиваючий агент бажано являє собою 2-(1H-бензотріазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуроніл гексафторфосфат (HBTU). Його бажано додавати до розчину 1-(циклопропілкарбоніл)піперазину або його солі мінеральної кислоти, діізопропілетиламіну та сполуки D протягом, наприклад, 30 хвилин. Температуру утвореного розчину можна підтримувати при близько 25°C або нижче (або 20°C чи нижче, наприклад, 18°C). Після додавання, утворений розчин можна залишити для відстоювання певний період часу. Бажаніше витримувати розчин при кімнатній температурі протягом 2 годин.

Утворену сполуку А можна видалити з розчину, охолоджуючи його нижче 10°C (або нижче 5°C, наприклад, до 3°C) протягом певного періоду часу (наприклад, 1 години), і фільтруючи. Утворену сполуку А можна промити, наприклад, холодним ацетонітрилом.

У WO 2004/080976 була представлена наступна схема синтезу сполуки D:



Диметил фосфіт по краплях додавали до розчину метоксиду натрію у метанолі при 0°C. Потім невеликими порціями до реакційної маси, яка мала вигляд глини у метанолі, додавали 2-карбоксibenзальдегід (H), підтримуючи температуру нижче 5°C. Отриманий світло жовтий розчин нагрівали до 20°C понад 1 години. Метансульфонову кислоту по краплях додавали до реакційної маси з утворенням білої суспензії, яку випарювали під вакуумом. Білий осад гасили водою та екстрагували хлороформом. Об'єднані органічні екстракти промивали водою, сушили над MgSO_4 та випаровували під вакуумом, отримуючи диметиловий ефір (3-оксо-1,3-дигідро-ізобензофуран-1-іл)фосфонової кислоти (G) у вигляді білої твердої речовини (вихід: 95 %). Речовину використовували на наступній стадії без подальшого очищення.

До суміші диметилового ефіру (3-оксо-1,3-дигідро-ізобензофуран-1-іл)фосфонової кислоти (G) у тетрагідрофурані і 2-фторо-5-формілбензонітрилу (F) у тетрагідрофурані додавали по краплях триетиламін протягом більше 25 хв при температурі нижче 15°C. Реакційну суміш поволі нагрівали до 20°C понад 1 години і випарювали під вакуумом. Білий осад суспензували у воді протягом 30 хвилин, фільтрували, промивали водою, гексаном і ефіром та сушили, отримуючи 2-фторо-5-(3-оксо-3Н-ізобензофуран-1-іліденметил)бензонітрил (E) із співвідношенням E і Z ізомерів 50:50 (вихід: 96 %).

До суспензії 2-фторо-5-(3-оксо-3Н-ізобензофуран-1-іліденметил)бензонітрилу (E) у воді додавали водний розчин гідроксиду натрію і реакційну суміш нагрівали у атмосфері азоту до 90°C протягом 30 хвилин. Реакційну суміш частково охолоджували до 70°C, і додавали гідразин-гідрат та перемішували протягом 18 годин при 70°C. Суміш охолоджували до кімнатної температури і підкислювали 2M HCl до pH 4, перемішували протягом 10 хвилин і фільтрували. Кінцевий продукт промивали водою, гексаном, ефіром, етилацетатом і сушили, отримуючи сполуку D у вигляді блідо рожевої твердої речовини (вихід: 77%).

Тому бажано було розробити вдосконалений спосіб синтезу сполуки D.

Відповідно п'яте втілення даного винаходу представляє спосіб синтезу сполуки D, що включає стадії:

(а) синтезування діетил(3-оксо-1,3-дигідро-2-бензофуран-1-іл)фосфонату (G') з 2-карбоксibenзальдегіду (H);

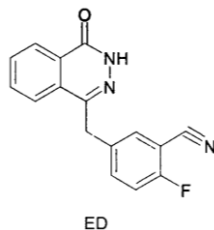
(b) синтезування 2-фторо-5-[(E/Z)-(3-оксо-2-бензофуран-1(3H)-іліден)метил]бензонітрилу (E) з діетил(3-оксо-1,3-дигідро-2-бензофуран-1-іл)фосфонату.

Вважається краще, щоб сполука G' не виділялася під час синтезу. У даному способі не використовується натрієва сіль диметилфосфіту, який є нестійким у спиртовому розчині (Pelchowicz, et al., J. Chem. Soc, 4348-4350 (1961)). Також краще, щоб стадія (а) велася у 2-метилтетрагідрофурані, в якому натрієва сіль диметилфосфіту стійка. Цю сіль можна отримувати *in situ* додаючи діетилфосфіт до охолодженого розчину t-аміляту натрію у 2-метилтетрагідрофурані. Після реакції з натрієвою сіллю діетилфосфіту можна проводити реакцію з метансульфоновою кислотою.

Стадію (b) можна вести у середовищі 2-метилтетрагідрофурану з додаванням триетиламіну.

Спосіб синтезу сполука D може крім того включати стадії:

(с) синтезування 2-фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазин-1-іл)метил]бензонітрилу (ED):

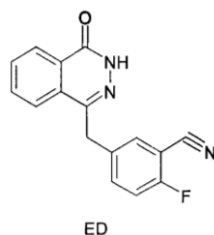


зі сполуки E реакцією з гідразин-гідратом; і

(d) синтезування сполуки D зі сполуки ED реакцією з гідроксидом натрію.

Стадію (с) можна проводити використовуючи від 1.1 до 1.3 еквівалентів гідразин-гідрату у тетрагідрофурані з подальшою нейтралізацією надлишкового гідразин-гідрату оцтовою кислотою.

Шосте втілення даного винаходу представляє сполуку ED:



і її використання у синтезі сполуки D.

Подальше втілення винаходу представляє сіль мінеральної кислоти та 1-(циклопропілкарбоніл)піперазину і спосіб її синтезу реакцією піперазину з оцтовою кислотою з подальшим додаванням циклопропанкарбоніл хлориду.

Сьоме втілення даного винаходу представляє фармацевтичну композицію, що включає сполуку, яка представлена у першому втіленні, та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

Восьме втілення даного винаходу представляє спосіб лікування тіла людини або тварини сполукою, яка представлена у першому втіленні винаходу.

Дев'яте втілення даного винаходу представляє використання сполуки, яка представлена у пер-

шому втіленні винаходу, у виробництві ліків для інгібування діяльності PARP.

Подальші втілення винаходу представляють використання сполуки, яка представлена у першому втіленні винаходу, для виробництва ліків для лікування: хвороб судин; септичного шоку, ішемічного ураження, нейротоксичності; геморагічного шоку; вірусної інфекції або хвороб, що лікуються інгібуванням діяльності PARP.

Наступні втілення винаходу стосуються використання сполуки, яка представлена у першому втіленні винаходу, для виробництва ліків, що використовуються як допоміжні засоби при терапії раку або для потенціювання клітин пухлини з метою подальшого лікування іонізуючим опромінюванням або хіміотерапією.

Інші втілення винаходу представляють спосіб лікування хвороби, що покращується при інгібуванні діяльності PARP, що включає введення пацієнту, при потребі лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки, яка представлена у першому втіленні винаходу, бажано у формі фармацевтичної композиції і спосіб лікування раку, що включає введення пацієнту, при потребі лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки, яка представлена у першому втіленні винаходу, бажано у формі фармацевтичної композиції, одночасно або послідовно з іонізуючими випромінюванням або хіміотерапією.

У наступних втіленнях даного винаходу, сполуки можна застосовувати для виготовлення ліків для лікування раку при недостатній гомологічній рекомбінації (ГР), що залежить від репараційної активності DSB ДНК, або для лікування пацієнту, хворого на рак, при недостатній гомологічній рекомбінації (ГР), що залежить від репараційної активності DSB ДНК, яке включає введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки.

ГР, що залежить від шляху репарації DSB ДНК, відновлюються двониткові розриви ДНК (DSBs) за гомологічними механізмами, що веде до виправлення неперервної спіралі ДНК (K.K. Khanna and S.P. Jackson, *Nat. Genet.* 27(3): 247-254 (2001)). Складові ГР, що залежить від шляху репарації DSB ДНК включають, але не обмежуються, ATM (NM_000051), RAD51 (NM_002875), RAD51L1 (NM_002877), RAD51C (NM_002876), RAD51L3 (NM_002878), DMC1 (NM_007068), XRCC2 (NM_005431), XRCC3 (NM_005432), RAD52 (NM_002879), RAD54L (NM_003579), RAD54B (NM_012415), BRCA1 (NM_007295), BRCA2 (NM_000059), RAD50 (NM_005732), MRE11A (NM_005590) та NBS1 (NM_002485). Інші білки, що залучені до ГР, яка залежить від шляху репарації DSB ДНК, включають регуляторні фактори як, наприклад, EMSY (Hughes-Davies, et al., *Cell*, 115, pp523-535). Складові ГР також описані у Wood, et al., *Science*, 291, 1284-1289 (2001).

Рак при недостатній гомологічній рекомбінації (ГР), що залежить від репарації DSB ДНК, може включати або стосуватися однієї або декількох клітин раку, які мають меншу або зовсім позбавлені здатності відновлювати ДНК DSB шляхом, що притаманний нормальним клітинам, тобто актив-

ність ГР, що залежить від шляху репарації DSB ДНК може зменшуватися або зовсім зникати у одній або більше клітинах раку.

Активність однієї або більше складових ГР, що залежить від шляху репарації DSB ДНК, може зникати у одній або більше клітинах раку індивідуума, що хворий на рак при недостатній гомологічній рекомбінації (ГР), що залежить від репарації DSB ДНК. Складові ГР, що залежить від шляху репарації DSB ДНК, добре відомі з рівня техніки (наприклад, Wood, et al., *Science*, 291, 1284-1289 (2001)) і включають складові, які зазначені у списку вище.

У деяких переважних втіленнях винаходу, клітини раки можуть містити BRCA1 та/або BRCA2 дефіцитний фенотип, тобто у клітинах раку BRCA1 та/або BRCA2 активність зменшена або зовсім відсутня. Клітини раку з таким фенотипом можуть бути BRCA1 та/або BRCA2 дефіцитними, тобто у клітинах раку експресія та/або активність BRCA1 та/або BRCA2 може стати меншою або зовсім зникати, наприклад шляхом мутації або поліморфізму у кодї нуклеїнової кислоти або шляхом збільшення мутацій або поліморфізму у гені, що кодує регуляторний фактор, наприклад ген EMSY, який кодує регуляторний чинник BRCA2 (Hughes-Davies, et al., *Cell*, 115, 523-535).

BRCA1 і BRCA2 - відомі пригнічувані пухлини, чії аллелі дикого типу часто втрачаються в пухлинах гетерозиготних носіїв (Jasin M., *Oncogene*, 21(58), 8981-93 (2002); Tutt, et al., *Trends Mol Med.*, 8(12), 571-6, (2002)). Асоціація мутацій BRCA1 та/або BRCA2 при раку молочної залози добре відома з рівня техніки (Radice, P.J., *Exp Clin Cancer Res.*, 21(3 Suppl), 9-12 (2002)). Відомо, що ампліфікація гену EMSY, який кодує зв'язуючий фактор BRCA2, також пов'язана з раком молочної залози та яєчників.

Носії мутацій в BRCA1 та/або BRCA2 знаходяться в зоні підвищеного ризику захворювання на рак яєчника, простати і підшлункової залози.

У деяких переважних втіленнях винаходу, індивідуум гетерозиготний відносно однієї або декількох мінливостей, таких як мутації і поліморфізм, у BRCA1 та/або BRCA2 або їх регуляторах. Виявлення мінливості у BRCA1 і BRCA2 відоме з рівня техніки і описане, наприклад, у EP 699 754, EP 705 903, Neuhausen, S.L. and Ostrander, E.A., *Genet. Test*, 1, 75-83 (1992); Chappnis, P.O. and Foulkes, W.D., *Cancer Treat Res*, 107, 29-59 (2002); Janatova M., et al., *Neoplasma*, 50(4), 246-50 (2003); Jancarkova, N., *Ceska Gynekol.*, 68(1), 11-6 (2003)). Визначення ампліфікації BRCA2, що зв'язує фактор EMSY, описується у Hughes-Davies, et al., *Cell*, 115, 523-535.

Мутації і поліморфізм, що пов'язані з раком, можна виявити на рівні нуклеїнової кислоти, шляхом визначення наявності змін у послідовності нуклеїнової кислоти або на рівні білку, визначаючи наявність зміни у поліпептиді (наприклад мутації або алельних змін).

На Фіг. 1 представлено ЯМР спектр сполуки А після обробки водою (приклад 1);

На Фіг. 2 представлена дифракційна рентгенограма порошку сполуки А у формі А після обробки водою (приклад 1);

На Фіг. 3 представлена дифракційна рентгенограма порошку сполуки А у формі А;

На Фіг. 4 представлена дифракційна рентгенограма порошку сполуки А у формі сольвату;

На Фіг. 5 представлені ДСК криві сполуки А у формі А, що отримані при нагріванні зразку від 25°C до 325°C зі швидкістю 10°C за хвилину.

Використання

Даний винахід представляє сполуку А у формі А, як активну сполуку, особливо активну при інгібуванні діяльності PARP.

Термін "активна" використовується в даному винаході відносно сполуки, яка здатна інгібувати діяльність PARP. Один з дослідів, який зручно використовувати для визначення інгібування PARP запропонованою сполукою, описується в прикладах нижче.

Даний винахід крім того представляє спосіб інгібування діяльності PARP в клітині, який включає дію на зазначену клітину ефективної кількості активної сполуки, яка бажано має знаходитися у формі фармацевтично прийнятної композиції. Такий спосіб можна застосовуватися *in vitro* або *in vivo*.

Наприклад, зразок клітин можна вирощувати *in vitro* і до вже нього вводити активну сполуку, що діятиме на клітини, і досліджувати вплив сполуки на ці клітини. Прикладом "впливу" може бути кількість репарацій ДНК, що мали місце через певний час. Коли виявляється, що активна сполука має вплив на клітини, це можна використовувати як прогностичний або діагностичний маркер ефективності сполуки у способах лікування несучих клітин одного клітинного типу.

Термін "Лікування" в даному винаході використовується відносно умов лікування, загалом відноситься до лікування і терапії людини або тварини (наприклад у ветеринарних цілях) при якому досягається бажаний терапевтичний ефект, наприклад, інгібування прогресування захворювання, і включає зменшення швидкості прогресування захворювання, зупинення прогресування захворювання, покращення стану хворого і терапію захворювання. Лікування для профілактики також має місце.

Термін «допоміжна сполука» в даному винаході використовується відносно активної сполуки у поєднанні з відомими терапевтичними засобами. Такі засоби включають цитотоксичні курси медикаментів та/або іонізуючого опромінювання, що використовується при лікуванні різних типів раку. Зокрема відомо, що активні сполуки потенціюють дію ряду сполук, які застосовують для лікування раку хіміотерапією, що включає лікування топоізомеразою класу інгібіторів (наприклад топотекан, іринотекан, рубітеккан), більшістю відомих алкілюючих агентів (наприклад DTIC, темозоламід) та медикаментами на основі платини (наприклад карбоплатин, цисплатин).

Активна сполука також може використовуватися як добавки до культури клітин для інгібування PARP, наприклад, для того, щоб зробити клітину чутливою до дії відомих хіміотерапевтичних засобів або лікування іонізуючим опромінюванням *in vitro*.

Активну сполуку можна також використовувати як частину *in vitro* біологічного випробування, на-

приклад, для того, щоб визначити чи є ефект від лікування сполукою.

Введення

Активну сполуку або фармацевтичну композицію, що включає активну сполуку, можна вводити об'єкту будь-яким зручним способом, застосовуючи соматично/периферійно або до інших необхідних місць, зокрема, але не обмежуючись наведеними прикладами: орально (наприклад ковтаючи); місцево (зокрема, наприклад, трансдермально, назально, офтальмологічно, трансбуккально, сублінгвально); пульмонально (наприклад інгаляцією або інсуфляцією, наприклад за допомогою аерозолу, наприклад через рот або ніс); ректально; вагінально; парентерально, наприклад, ін'єкцією, зокрема підшкірним, крізьшкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, внутрішньосерцевим, інтратекальним, інтраспінальним, інтракапсулярним, субкапсулярним, інтраорбітальним, внутрішньоочеревиним, ендотрахеальним, під кутикулу, внутрішньосуставним, субарахноїдальним та надчеревним шляхом; вживленням депо, наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово.

Об'єктом може бути еукаріот, тварина, хребтна тварина, ссавець, гризун (наприклад морська свинка, хом'як, щур, миша), родина щурячих (наприклад миша), родина собачих (наприклад собака), родина котячих (наприклад кіт), родина парнокопитих (наприклад кінь), примати, мавпоподібні (наприклад мавпа або примат), мавпа (наприклад мармозетка, бабуїн), примат (наприклад горіла, шимпанзе, орангутанг, гібон), або людина.

Лікарські засоби

Якщо можливо вводити активну сполуку самостійно, бажано виготовляти фармацевтичну композицію (наприклад, засіб), що включає активну сполуку, як зазначено вище, разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, стимуляторами, допоміжними речовинами, роздіджувачами, заповнювачами, буферами, стабілізаторами, консервантами, лубрикантами та іншими матеріалами, які є відомими з рівня техніки і будь-які інші терапевтичні або профілактичні речовини.

З огляду на це, даний винахід представляє фармацевтичні композиції, як зазначено вище, і способи їх отримання, які включають змішування активної сполуки, як зазначено вище, разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, наповнювачами, буферами, допоміжними речовинами, стабілізаторами або іншими матеріалами, як описано вище, таким чином, щоб активна сполука А залишилася у вигляді кристалічної форми А.

Термін "фармацевтично прийнятний" тут використовується відносно сполук, матеріалів, композицій, та/або форм дозування, які, після ретельного медичного обстеження, можуть використовуватися та контактувати з тканинами об'єкту (наприклад людини), не є токсичними, не викликають свербіж, алергічної реакції або інших побічних дій або ускладнень, враховуючи розумне співвідношення вигоди до ризику. Кожен носій, наповнювач, і т.п., повинен також бути "прийнятний"

в значенні сумісності з іншими інгредієнтами композиції.

Відповідні носії, розріджувачі, наповнювачі, і т.п., можуть бути знайдені в стандартних фармацевтичних довідниках, наприклад, "Handbook of Pharmaceutical Additives", 2nd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA), "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; and "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2nd edition, 1994.

Композиції можуть бути зручними для використання у вигляді однієї дози, яка може бути виготовлена будь-якими способом, добре відомими з рівня техніки. Такі способи включають стадію введення у лікарський засіб активної сполуки з носієм, який складається з одного або декількох додаткових інгредієнтів. Взагалі, лікарський засіб виготовляють безпосередньо вводючи в нього активну сполуку однорідно розподілену у рідкому носії або тонко подрібненому твердому носії або в них обох, а потім, за необхідності, формують сам продукт.

Лікарський засіб може бути у формі суспензії, таблеток, гранул, порошків, капсул, ампул, пілюль або паст.

Лікарський засіб для орального введення (наприклад ковтання) може знаходитися у вигляді як окремої одиниці, наприклад, капсули, ампули або таблетки, кожна з яких має відповідну кількість активної сполуки; так і у формі порошку або гранули; суспензії у водній або безводній рідині; пасті.

Таблетка може виготовлятися відповідним відомим способом, наприклад пресуванням або формуванням разом з одним або декількома додатковими інгредієнтами. Спресовані таблетки можуть виготовлятися шляхом пресування у відповідній машині активної сполуки у вільно текучій формі, наприклад порошку або гранули, за необхідності разом з однією або декількома в'язкими речовинами (повідон, желатин, камедь, сорбітол, трагант, гідроксіпропілметил целюлоза); наповнювачами або розріджувачами (наприклад, лактоза, мікрокристалічна целюлоза, гідрофосфат кальцію); лубрикант (наприклад, магнію стеарат, тальк, кремнезем); розпушувачами (наприклад, натрію гліколят крохмаль, повідон з поперековими міжмолекулярними зв'язками, натрій карбоксиметил целюлоза з поперековими міжмолекулярними зв'язками); поверхнево активними диспергуючими або змочувальними речовинами (лаурилсульфат натрію); і консервантами (наприклад, метил п-гідроксибензоат, пропіл п-гідроксибензоат, сорбінова кислота). Формовані таблетки можна виробляти формуючи у відповідній машині суміші порошкоподібної сполуки зволоженої інертними рідким розчинниками. Таблетки можуть бути як покриті оболонкою так і з ризкою і можуть бути сформованими таким чином, щоб забезпечувати повільне або кероване вивільнення активної сполуки, що здійснюється за допомогою, наприклад, гідроксіпропілметил целюлози в різних пропорціях, від якої залежить бажана швидкість вивільнення. Таблетки

можуть мати ентросолубильну оболонку, щоб забезпечити вивільнення речовини у кишках, а не у шлунку.

Капсула можуть містити активну сполуку у вигляді суспензії.

Лікарський засіб для місцевого введення (трансдермально, назально, офтальмологічно, трансбуккально або сублінгвально) може мати вигляд пасті.

Лікарський засіб для місцевого введення до ока також може бути у вигляді очних крапель, де активна сполука суспензована у відповідному носії, особливо у відповідному водному розчиннику активної сполуки.

Лікарський засіб для назального введення може містити твердий носій, наприклад грубий порошок з розміром частинок, наприклад, від близько 20 до близько 500 мікрон, який вводиться так само як нюхальний тютюн, тобто швидко вдихаючи крізь носовий хід порошку, який знаходиться у ємності, яку тримають близько до носу.

Лікарський засіб для введення як інгаляції може мати форму аерозольного спрею у герметичній упаковці за наявності відповідного пропеланту, як наприклад дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, вуглекислого газу, або інших відповідних газів.

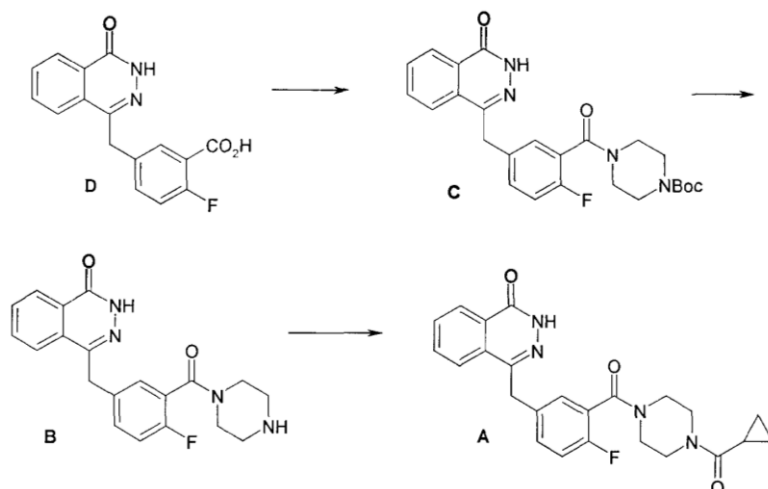
Дозування

Важливо, що відповідні дози активної сполуки, і композицій, що включають активну сполуку, можна змінювати залежно від потреб пацієнта. Визначення оптимальної дози загалом полягає у врівноваженні рівня терапевтичного ефекту та будь-якого ризику або шкідливих побічних ефектів від лікування засобами даного винаходу. Обране дозування залежатиме від різноманітних чинників, які включають, але не обмежуються, активність специфічної сполуки, спосіб введення, час введення, швидкість виведення сполуки, тривалість лікування, застосування додаткових ліків, сполук, та/або матеріалів, вік, стать, вагу, загальний стан здоров'я і попередню медичну історію пацієнта. Визначення кількості сполуки і способу введення знаходиться на розсуді лікаря, хоча загалом ліки досягають місцевих концентрацій у необхідній частині організму, завдяки чому досягається бажаний ефект не спричиняючи істотно небезпечного або шкідливого впливу. Введення *in vivo* можна здійснювати однією дозою, безперервно або періодично (наприклад, поділити дозу і вводити її з відповідними інтервалами) протягом курсу лікування. Спосіб визначення найбільш ефективних шляхів введення і дозування добре відомі з рівня техніки і змінюються залежно від того чи використовуються вони для терапії, цільової терапії, лікування клітини-мішені або об'єкту. Одно- або багаторазові введення, дозування та шлях введення визначаються лікарем.

Взагалі, відповідна доза активної сполуки знаходиться в ряду від близько 10 мг до близько 600 мг на м² площі тіла та ваги за день.

Приклади

Приклад 1: Синтез сполуки А



Вихідна сполука (D) була синтезована способом, який був описаний у WO 2004/080976

Способи

Підготовча ВЕРХ

Зразки очищали напрямленою водною масою очисною системи Waters, що складалася з водного насосу Waters 600 LC, Waters Xterra C18 колонки (5 μ m 19 mm \times 50 mm) і Micromass ZQ маспектрометру, який використовує іонізаційний метод електророзпилення позитивних іонів. Рухомі фази А (0.1% мурашиної кислоти у воді) і В (0.1% мурашиної кислоти у ацетонітрилі) поступово змінювалися у співвідношенні від 5% В до 100% протягом понад 7 хв, витримка 3 хв, швидкість руху рідини 20 мл/хв.

Аналітична ВЕРХ-MS

Аналітична ВЕРХ здійснювалася на Spectra System P4000 pump та Jones Genesis C18 (4 μ m, 50 mm \times 4.6 mm). Рухомі фази (0.1% мурашиної кислоти у воді) і В (ацетонітрил) поступово змінювалися у співвідношенні до 5% В протягом 1 хв та до 98% В через 5 хв, витримка 3 хв, швидкість руху рідини 2 мл/хв. Аналізували TSP UV 6000LP детектором при 254 нм УФ TSP UV 6000LP і 210-600 нм ФДМ (фотодіодна матриця PDA). Використовували маспектрометр Finnigan LCQ, який використовує іонізаційний метод електророзпилення позитивних іонів.

ЯМР

¹H ЯМР спектри були зняті на Bruker DPX 300 спектрометрі при 300 мгц. Хімічні зсуви були визначені у мільйонних долях (ppm) у δ масштабі відносно внутрішнього стандарту тетраметилсілану. Всі зразки були розчинені у DMSO-d₆.

(а) трет-бутильний ефір 4-[2-Фторо-5-(4-оксо-3,4-дигідро-фталазін-1-ілметил)-бензоїл]-піперазин-1-карбокси кислоти (С)

До розчину вихідної сполуки D (850 г) у диметилацетаміді (DMA) (3561 мл) при перемішуванні за кімнатної температури у атмосфері азоту додавали HBTU (2-(1H-бензотріазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуроніл гексафторфосфат) (1402 г) однією порцією. Потім додавали основу Hünig's (iPr₂NEt, 1096 мл) при температурі від 15 до 25°C, після чого додавали розчин 1-трет-бутоксикарбоніл-піперазину (637 г) у DMA (1428 мл) при температурі від 15 до 25°C.

Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин, відбираючи проби для аналізу (ВЕРХ). Після завершення реакції до розчину при сильному перемішуванні додавали воду (17085 мл) при температурі від 15 до 25°C, відфільтрували осад, промивали водою (2 \times 7131 мл), гексаном (2 \times 7131 мл) і метил-трет-бутил ефіром (МТБЕ) (2 \times 3561 мл). Осад сушили протягом ночі та аналізували вміст води та хімічну чистоту.

Реакцію повторювали:

Реакція	Вихід (г)	Чистота (ВЕРХ площа%)	Вміст води (К.Ф.)	Відкоректований вихід
1	1571.3	86.80	24.3	1032.5 g (78%)
2	2781.6	85.00	40.3	1411.5 g (106%)

Більш ніж 100% вихід пояснюється не показовим зразком

(b) 4-[4-Фторо-3-(піперазин-1-карбоніл)-бензил]-2H-фталазін-1-он (В)

При перемішуванні до розчину технічного денатурату (IMS) (2200 мл) і концентрованої HCl (4400 мл) по частинах при кімнатній температурі в атмосфері азоту додавали сполуку С (2780.2 г),

спінюванням керували швидкістю додавання. Потім розчин розмішували при 15 - 25°C протягом 30 хвилин і аналізували (ВЕРХ).

Після завершення реакції розчин випаровували, щоб видалити IMS, а водний розчин екстрагували CH₂Cl₂ (2 \times 3500 мл), доводили рН до >8

концентрованим аміаком. Отриману глину розбавляли водою (10000 мл), екстрагували CH_2Cl_2 (4×3500 мл), промивали водою (2×2000 мл), сушили над MgSO_4 (250 г) і випаровували. Сирий продукт суспензували у CH_2Cl_2 (3500 мл) і додавали MTBE (5000 мл). Суспензію, що утворювалася, фільтрували і сушили при 50°C протягом ночі, отримували 611.0 г (вихід 58.5%) речовини чистотою 94.12%.

(с) 4-[3-(4-Циклопропанкарбоніл-піперазт-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2Н-фталазін-1-он (А)

При перемішуванні до суспензії сполуки В (1290 г) у CH_2Cl_2 (15480 мл) в атмосфері азоту по краплях при температурі нижче 20°C додавали заздалегідь зроблений розчин триетиламіну (470 мл) і циклопропан карбоніл хлориду (306 мл) у CH_2Cl_2 (1290 мл). Після цього розчин перемішували при $10\text{--}15^\circ\text{C}$ протягом 15 хвилин і аналізували. Реакційна суміш містила тільки 1.18% вихідної сполуки В, тому реакцію вважали завершеною і суміш обробляли.

Реакційну суміш промивали водою (7595 мл), 5% розчином лимонної кислоти (7595 мл), 5% розчином карбонату натрію (7595 мл) і водою (7595 мл). Органічний шар сушили над сульфатом магнію (500г).

CH_2Cl_2 шар фільтрували на целіті. CH_2Cl_2 (8445 мл) відганяли при атмосферному тиску і додавали етанол (10000 мл). Потім, під час перегон-

ки, після кожних 4000 мл дистиляту, який зливали, додавали етанол (4000 мл), поки температура парів не досягала 73.7°C . Реакційний об'єм зменшувався (до 7730 мл), а температура парів досягала 78.9°C , після чого розчин охолоджували до 8°C протягом ночі. Осад відфільтрували, промивали етанолом (1290 мл) і сушили при 70°C протягом ночі.

Вихід = 1377.3 г (90%). Чистота згідно ВЕРХ (99.34% [область %]). Продукт містив 4.93% етанолу і 0.45% CH_2Cl_2 згідно ГХ.

(d) Обробка сполуки А водою

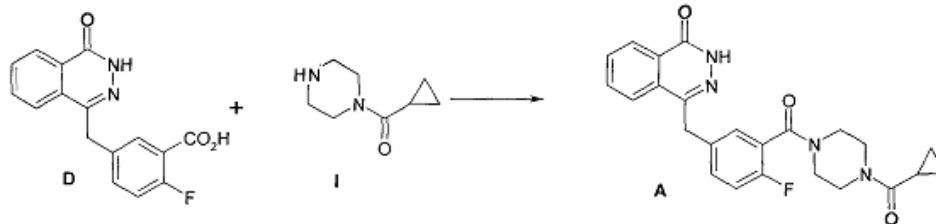
Суспензію сполуки А (1377.0 г), отриману способом наведеним у Прикладі 1, у воді (13770 мл) кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 4 годин, охолоджували до кімнатної температури і фільтрували. Осад промивали водною (2754 мл) і сушили при 70°C протягом ночі.

Вихід = 1274.8 г (92.6%). Продукт згідно ГХ містив 0.01% етанолу і 0.01% CH_2Cl_2 , чистота за ВЕРХ (99.49% [область %]).

^1H ЯМР спектр сполуки А (DMSO-d_6) після обробки водою представлено на Фігурі 1.

Дифракційна рентгенограма порошку сполуки А після обробки водою представлено на Фігурі 2, яка показує, що сполука А знаходиться у формі А.

Приклад 2: Альтернативний синтез сполуки А з 1-(циклопропілкарбоніл) піперазину



Способи (також для Прикладів 3 та 4)

^1H ЯМР спектри були зняті на Bruker DPX 300 спектрометрі при 300 мгц. Хімічні зсуви були визначені у мільйонних долях (ppm) у δ масштабі відносно внутрішнього стандарту тетраметилсілану. Всі зразки були розчинені у DMSO-d_6 .

Масспектри

Масспектри знімали на Agilent XCT масспектрометрі з іонною пасткою з використанням тандемної масспектроскопії (MS/MS) для підтвердження структури. Прилад працював за іонізаційним методом електророзпилення позитивних іонів.

(а) 4-[3-(4-Циклопропанкарбоніл-піперазин-1-карбоніл)-4-фторо-бензил]-2Н-фталазін-1-он (Сполука А)

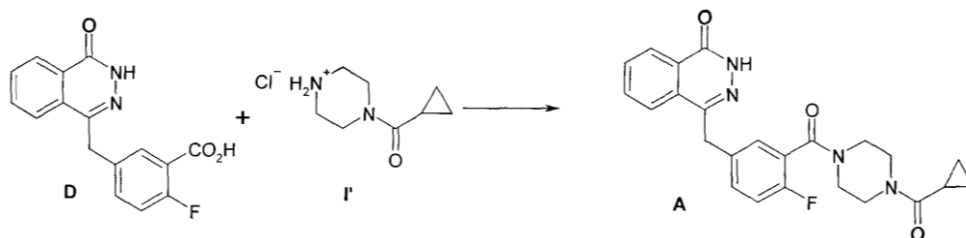
2-Фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазін-1-іл)метил]бензойну кислоту (D) (15.23г, 51.07 ммоль) суспензували при перемішуванні в атмосфері азоту у ацетонітрилі (96 мл). Після цього додавали діізопропілетиламін (19.6 мл, 112.3 ммоль) та 1-циклопропілкарбонілпіперазин (I) (9.45г, 61.28

ммоль) і ацетонітрил (1 мл). Реакційну суміш охолоджували до 18°C . о-Бензотриазол-1-іл-тетраметилуроніл гексафторфосфат (25.18г, 66.39 ммоль) додавали протягом понад 30 хвилин, після чого реакційна суміш перемішувалася протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш охолоджували до 3°C і витримували при цій температурі протягом 1 години та фільтрували. Відфільтрований осад промивали холодним (3°C) ацетонітрил (20 мл) перед сушкою під вакуумом при 40°C , отримуючи продукт блідо жовтого кольору (20.21 г).

Масспектр: MH^+435

^1H ЯМР (400MHz, DMSO-d_6) δ : 0.70 (м., 4H), 1.88 (шс, 1H), 3.20 (шс, 2H), 3.56 (м., 6H), 4.31 (с, 2H), 7.17 (т, 1H), 7.34 (дд, 1H), 7.41 (м, 1H), 7.77 (дт, 1H), 7.83 (дт, 1H), 7.92 (д, 1H), 8.25 (дд, 1H), 12.53 (с, 1H).

Приклад 3: Альтернативний синтез сполуки А з солі соляної кислоти 1-(циклопропілкарбоніл) піперазину



(а) сіль соляної кислоти 1-(Циклопропілкарбоніл) піперазину (I')

Оцтову кислоту (700 мл) порціями змішували з піперазином (50.00г, 0.581 моль) протягом понад 15 хвилин при перемішуванні в атмосфері азоту, реакційну суміш нагрівали до 40°C і витримували при цій температурі до повного розчинення. Хлорид циклопропанкарбонілу (59.2 мл, 0.638 моль) додавали понад 15 хвилин. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Реакційну суміш фільтрували і фільтрат перегоняли при зниженому тиску, поки не отримували ~430 мл дистилляту. Толуол (550 мл) додавали до реакційної маси і продовжували перегонку при зниженому тиску поки не отримували ще 400 мл дистилляту. Після чого додавали наступну порцію толуолу (550 мл) і продовжували перегонку при зниженому тиску поки не отримували ще 350 мл дистилляту. Отриману глину розбавляли толуолом (200 мл) і перемішували протягом ночі. Наступну порцію толуолу (500 мл) додавали, щоб зробити глину рухомою, фільтрували, промивали толуолом (100 мл) і сушили під вакуумом при 40°C, отримуючи біло-жовтий продукт (86.78 г).

Масспектр: MH+155

¹H ЯМР (400MHz, D₂O) δ: 0.92 (м., 4H), 1.98 (м., 1H), 3.29 (м., 2H), 3.38 (м., 2H), 3.84 (м., 2H), 4.08 (м., 2H).

(b) Сполука А

2-Фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазин-1-іл)метил]бензойну кислоту (D) (0.95 г, 3.19 ммоль) суспензували при перемішуванні у атмосфері азоту в ацетонітрилі (4 мл). До суміші додавали 2-(1H-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуроніл гексафторфосфат (HBTU) (1.45г, 3.83 ммоль) після чого додавали сіль соляної кислоти 1-циклопропілкарбонілпіперазин (I') (0.73 г, 3.83 ммоль). Діізопропілетиламін (1.39 мл, 7.98 ммоль) додавали протягом понад 3 хвилини, реакційну суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Реакційну суміш охолоджували до 5°C і витримували при цій температурі протягом 1 години, фільтрували. Відфільтрований осад промивали холодним (3°C) ацетонітрилом (2 мл) та сушили під вакуумом при 40°C, отримуючи біло-жовтий продукт (0.93 г).

(с) Перекристалізація сполуки з водного метанолу

Сполуку (9.40 г, 21.64 ммоль) зі стадії (b) суспензували у суміші води (100 мл) і метанолу (120 мл). Суспензію кип'ятили зі зворотним холодильником при перемішуванні. Утворений мутний розчин охолоджували до 60°C і фільтрували через карболітовий фільтр. Фільтр промивали сумішшю води (5 мл) і метанолу (5 мл). Фільтрат переганяли при атмосферному тиску, поки 115 мл дистилляту не було зібрано. Перегонку зупиняли і суспензію охолоджували до кімнатної температури. Отриману суспензію перемішували протягом ~18 годин перед фільтруванням. Відфільтрований осад промивали водою (20 мл), сушили під вакуумом при 60°C, отримуючи сполуку А у формі А у вигляді білих кристалів (8.67 г).

Масспектр: MH+435

¹H ЯМР (400MHz, DMSO-d₆) δ: 0.70 (м., 4H), 1.88 (шс, 1H), 3.20 (шс, 2H), 3.56 (м., 6H), 4.31 (с, 2H), 7.17 (т, 1H), 7.34 (дд, 1H), 7.41 (м., 1H), 7.77 (дт, 1H), 7.83 (дт, 1H), 7.92 (д, 1H), 8.25 (дд, 1H), 12.53 (с, 1H).

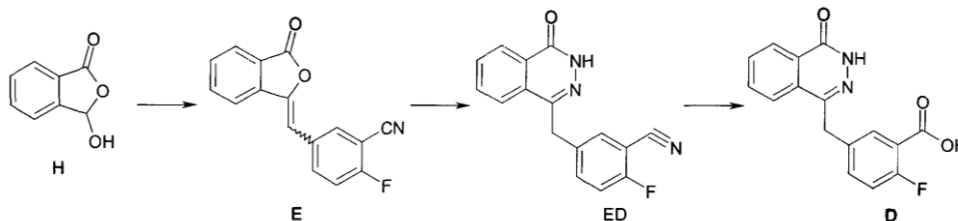
(d) Перекристалізація сполуки А з водного етанолу

Сполуку (9.40 г, 21.64 ммоль) зі стадії (b) суспензували у суміші води (100 мл) і етанолу (50 мл). Суспензію кип'ятили зі зворотним холодильником при перемішуванні. Утворений мутний розчин потім охолоджували до 60°C і фільтрували через карболітовий фільтр. Фільтр промивали сумішшю води (5 мл) і етанолу (5 мл). Фільтрат переганяли при атмосферному тиску, поки 53 мл дистилляту не було зібрано. Перегонку зупиняли і суспензію охолоджували до кімнатної температури. Отриману суспензію перемішували протягом ~18 годин перед фільтруванням. Відфільтрований осад промивали водою (20 мл), сушили під вакуумом при 60°C, отримуючи сполуку А у формі А у вигляді білих кристалів (8.74 г).

Масспектр: MH+435

¹H ЯМР (400MHz, DMSO-d₆) δ: 0.70 (м., 4H), 1.88 (шс, 1H), 3.20 (шс, 2H), 3.56 (м., 6H), 4.31 (с, 2H), 7.17 (т, 1H), 7.34 (дд, 1H), 7.41 (м., 1H), 7.77 (дт, 1H), 7.83 (дт, 1H), 7.92 (д, 1H), 8.25 (дд, 1H), 12.53 (с, 1H).

Приклад 4: Альтернативний синтез сполуки D



(а) 2-Фторо-5-[(E/Z)-(3-оксо-2-бензофуран-1(3H)-іліден) метил]бензонітрж (E)

Натрію t-амілят (99.00 г, 0.854 моль) і 2-метилтетрагідрофуран (960 мл) охолоджували до 2°C у атмосфері азоту. Діетиловий фосфіт (110 мл, 0.855 моль) додавали по краплях, підтримуючи температуру близько <5°C. 2-Метилтетрагідрофуран (40 мл) додавали миттєво. Реакційну суміш перемішували при 2°C протягом 1 години 40 хвилин. Розчин 2-карбоксібензальдегіду (H) (80 г, 0.533 моль) у 2-метилтетрагідрофурані (200 мл) додавали до реакційної суміші, підтримуючи температуру близько <7°C після чого миттєво додавали 2-метилтетрагідрофуран (40 мл). Реакційну суміш нагрівали до 20°C і витримували при 20°C протягом 20 хвилин. Метансульфонову кислоту (66 мл, 1.01 моль) додавали протягом понад 1 години і 10 хвилин, потім додавали 2-метилтетрагідрофуран (40 мл) і перемішували при 20°C протягом ночі. Додавали метансульфонову кислоту (7 мл, 0.101 моль) після чого знов додавали 2-метилтетрагідрофуран (7 мл) і утворену суміш перемішували при 20°C наступні 4 години. До реактору додавали воду (400 мл) при кімнатній температурі і утворену двофазну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Нижній водний шар відділяли, а до органічного шару додавали розчин бікарбонату калію (53.50 г, 0.534 моль) у воді (400 мл). Двофазну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин а потім нижній водний розчин відділяли. Органічний шар залишали на певний час (розчин діетил(3-оксо-1,3-дигідро-2-бензофуран-1-іл)фосфонату). 2-Фторо-5-формілбензонітрил (64 г, 0.429 моль) додавали до органічної фракції, перемішували при 20°C. Триетиламін (66 мл, 0.473 моль) додавали по краплях після чого приливали 2-метилтетрагідрофуран (7 мл). Реакційну суміш перемішували при 20°C протягом ночі, охолоджували до 5°C, фільтрували, промивали технічним денатуратом (480 мл) а потім сушили під вакуумом при 40°C, отримуючи необхідний продукт (91.2 г).

Масспектр: MH+266

¹H ЯМР (400MHz, DMSO-d₆) δ: 6.89 (с, 1H, головний ізомер), 6.94 (с, 1H, незначна кількість іншого ізомеру), 7.40 (дд, 1H, незначна кількість іншого ізомеру), 7.58 (т, 1H, обидва ізомери), 7.70 (т, 1H, обидва ізомери), 7.89 (т, 1H, обидва ізомери), 7.95 (д, 1H, обидва ізомери), 8.05 (д, 1H, обидва ізомери), 8.15 (м., 2H, головний ізомер).

(b) 2-Фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазін-1-іл)метил]бензонітрил (ED)

2-Фторо-5-[(E/Z)-(3-оксо-2-бензофуран-1(3H)-іліден)метил]бензонітрил (E) (20 г, 75.40 ммоль) і

тетрагідрофуран (200 мл) перемішували при кімнатній температурі у атмосфері азоту протягом 30 хвилин. Потім додавали гідрозин-моногідрат (4.40 мл, 90.53 ммоль) та тетрагідрофуран (4 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години 45 хвилин. Додавали оцтову кислоту (1.10 мл, 19.20 ммоль) і нагрівали реакційну суміш до 60°C, витримували при 60°C протягом ночі. Реакційну суміш охолоджували до 50°C і додавали по краплях воду (200 мл). При додаванні температуру підтримували близько 45°C. Реакційну суміш охолоджували до 20°C, фільтрували, промивали сумішшю води (30 мл) і тетрагідрофурану (30 мл), а потім сушили під вакуумом при 40°C, отримуючи необхідний продукт (18.7 г).

Масспектр: MH+280

¹H ЯМР (400MHz, DMSO-d₆) δ: 4.38 (с, 2H), 7.46 (т, 1H), 7.72 (м., 1H), 7.85 (дт, 1H), 7.92 (м., 2H), 7.99 (д, 1H), 8.27 (дд, 1H), 12.57 (с, 1H).

(с) 2-Фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазін-1-іл)метил]бензойна кислота (D)

2-Фторо-5-[(4-оксо-3,4-дигідрофталазін-1-іл)метил]бензонітрил (ED) (9.60 г, 34.37 ммоль) і воду (40 мл) перемішували при 20°C. 2M Додавали гідроксид натрію (36 мл, 72.00 ммоль), після чого реакційну суміш нагрівали до 90°C і витримували при цій температурі протягом ночі. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і фільтрували. Фільтр промивали водою (10 мл) і до об'єданого фільтрату додавали 2M HCl (56 мл, 112.00 ммоль) при 60°C протягом понад 40 хвилин. Отриману суспензію охолоджували до 50°C і фільтрували, промивали водою (57 мл) і сушили під вакуумом при 60°C, отримуючи продукт у вигляді білого порошку (9.72 г).

Масспектр: MH+299

¹H ЯМР (400MHz, DMSO-d₆) δ: 4.36 (с, 2H), 7.24 (дд, 1H), 7.59 (м., 1H), 7.84 (дт, 2H), 7.90 (дт, 1H), 7.98 (д, 1H), 8.27 (дд, 1H), 12.59 (с, 1H), 13.22 (ш, 1H).

Приклад 5: Перекристалізація сполуки A з водного етанолу

4-(3-[[4-(циклопропілкарбоніл)піперазін-1-іл]карбоніл]-4-фторобензінл)фталазін-1(2H)-он (сполуку A) (20.00г, 44.66 ммоль) суспензували у суміші води (50 мл) і етанолу (150 мл). Суспензію кип'ятили зі зворотним холодильником при перемішуванні. Отриманий розчин охолоджували до 70°C і фільтрували. Фільтр промивали сумішшю води (8 мл) і етанолу (22 мл).

Фільтрат охолоджували до 45°C при перемішуванні, до нього додавали 4-(3-[[4-(циклопропілкарбоніл)піперазін-1-іл]карбоніл]-4-

фторобензил)фалазін-1(2H)-он (сполуку А) у формі А (0.08 г), щоб висадити продукт. Утворену суспензію охолоджували до 20°C протягом понад 2.5 годин і перемішували при цій температурі наступні 16 годин для того, щоб сформувалися кристали. Воду (200 мл) додавали до суміші протягом понад 5 годин, підтримуючи температуру близько 20°C. Після чого суспензію витримували при 20°C протягом 2 годин.

Суспензію фільтрували і відфільтрований осад промивали сумішшю етанолу (24 мл) і води (56 мл). Відфільтрований осад сушили під вакуумом при 40-60°C, отримуючи сполуку А (форма А) у вигляді білого порошку (18.1 г).

Способи одержання Фігур 3-5

Дифракційна рентгенограма порошку - Фігура 3 (сполука А у формі А)

Дифракційна рентгенограма порошку була знята Bruker D5000 дифрактометром (довжина рентгенівської хвилі 1.5418 Å Cu джерело, напруга 40 кВ, емісія нитки накаливання 40 мА). Зразки сканували на проміжку 2-40° 2θ з кроком 0.02° кожні 4 с.

Дифракційна рентгенограма порошку - Фігура 4 (сполука А у формі сольвату)

Дифракційна рентгенограма порошку була знята Inel XRG-3000 дифрактометром (довжина рентгенівської хвилі 1.5418 Å Cu джерело, напруга 40 кВ, емісія нитки накаливання 40 мА), апроксимували відносно кривої чутливого детектору (приблизно 120° 2θ). Зразки сканували на проміжку 2.5-40° 2θ з кроком 0.03° протягом 300 с.

Диференційна скануюча калориметрія (ДСК) - Фігура 5

ДСК була знята Mettler DSC820E з роботизованою системою TSO801RO. Зазвичай менше ніж 5 мг речовини розміщували на 40µl алюмінієвій сковорідці з перфорованою кришкою, нагрівали до

температуру від 25°C до 325°C з кроком 10°C/хв. Використовувався чистий азот зі швидкістю потоку 100 мл/хв.

Приклад 6

Інгібуюча дія

Для того, щоб оцінити інгібуючу дію активної сполуки, проводили наступний експеримент визначення величини IC₅₀.

PARP ссавця, що був ізолюваний від екстракту ядер клітин HeLa, інкубували із Z-буфером (25 mM Hepes (Sigma); 12.5 mM MgCl₂ (Sigma); 50mM KCl (Sigma); 1 mM DTT (Sigma); 10% гліцерин (Sigma) 0.001% NP-40 (Sigma); pH 7.4) у 96-луночких FlashPlates (TRADE MARK) (NEN, UK) і додавали різну концентрацію зазначених інгібіторів до кожної лунки. Всі сполуки були розчинені у ДМСО і мали концентрації в ряду від 10 до 0.01 µM, з концентрацією ДМСО 1%. Загальний об'єм зразку складав 40 µl у кожній лунці.

Після 10 хвилинної інкубації при 30°C, ініціювали реакцію додаючи 10 µl реакційної суміші, що містила NAD (5 µM), ³H-NAD і 30мер двониткових ДНК-олігомерів. Виявлення лунок з позитивним і негативним результатом реакції проводили разом зі сполуками у лунках (невідомі) для того, щоб обчислити % активності ензиму. Потім плашки струшували протягом 2 хвилин і інкубували при 30°C протягом 45 хвилин.

Після інкубації реакцію гасили додаючи 50 µl 30% оцтової кислоти до кожної лунки. Плашки струшували протягом 1 години при кімнатній температурі.

Плашки переміщали до TopCount NXT (TRADE MARK) (Packard, UK) для сцинтиляційних вимірів. Значення записували за кількістю імпульсів на хвилину (срп), по 30 с на кожну лунку.

% активності ензиму для сполуки потім розраховувалася за наступним рівнянням :

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left(100 \times \frac{(\text{cpm of unknowns} - \text{mean negative cpm})}{(\text{mean positive cpm} - \text{mean negative cpm})} \right)$$

% інгібування = 100 - (100 × (срп невідомих - негативне значення срп)/(позитивне значення срп - негативне значення срп))

Значення IC₅₀ (концентрація, за якої 50% активності ферменту була інгібована) були визначені для всього ряду концентрацій від 10 µM до 0.001 µM. Ці значення IC₅₀ використовувалися як порівняльні, щоб визначити збільшення потенціалу сполуки.

Сполука має IC₅₀ близько 5 nM.

Фактор потенціювання

Фактор потенціювання (PF₅₀) активної сполуки обчислювався як співвідношення IC₅₀ росту клітин контрольного зразку до IC₅₀ росту клітин + інгібітор PARP. За наявності алкілюючого агенту метилметансульфонату (MMC) відбувається зростання кривих інгібування як контрольних так і оброблених сполукою клітин. Випробувальна сполука використовувалася у концентрації 0.2 мікромоль. Концентрація MMC становила від 0 до 10 µg/ml.

Ріст клітини визначався за допомогою сульфоходаміну В (SRB) (Skehan, P., et al., (1990)

New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107-1112.). 2,000 клітин HeLa сіялися у кожну лунку плоского 96-лункового титраційного мікропланшету об'ємом 100 100 µl та інкубували протягом 6 годин при 37°C. Всім клітинам замінювали середовище поки не встановлювалася концентрація 0.5, 1 або 5 µM. Клітини росли протягом 1 години перед додаванням MMC концентрацією 0, 1, 2, 3, 5, 7 до 10 µg/ml до оброблених та необроблених інгібітором PARP клітин. Клітини, оброблені інгібітором PARP, використовувалися для визначення збільшення інгібування інгібіторами PARP.

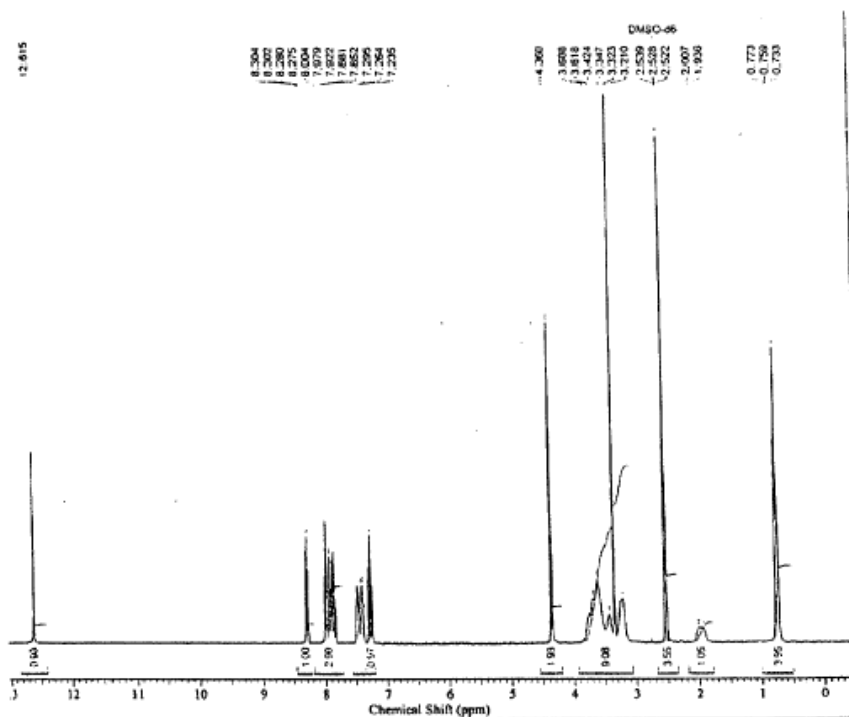
Клітини залишали на наступні 16 годин перед заміною середовища і потім залишали для росту протягом 72 години при 37°C. Середовище видаляли і клітини змішували з 100 мл крижаної 10% (маса/об'єм) трихлороцтової кислоти. Пластини інкубували при 4°C протягом 20 хвилин а потім промивали чотири рази водою. Кожну лунку з клітинами обробляли 100 мл 0.4% (маса/об'єм) SRB та 1% оцтовою кислотою протягом 20 хвилин після

чого промивали чотири рази 1% оцтовою кислотою. Пластини сушили протягом 2 годин при кімнатній температурі. Пігмент мічених клітин змивали розчином 100 мл 10 mM тріс основи, який додавали до кожної лунки. Пластини обережно

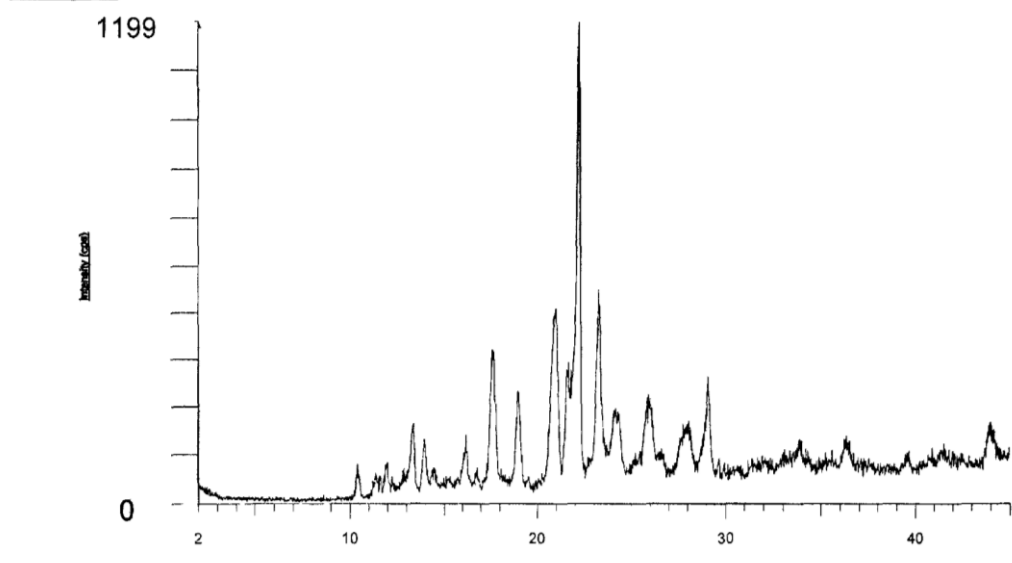
струшували і залишали при кімнатній температурі протягом 30 хвилин після чого вимірювали оптичну щільність при 564 nM на мікроквантовому читачеві титраційних мікропланшетів.

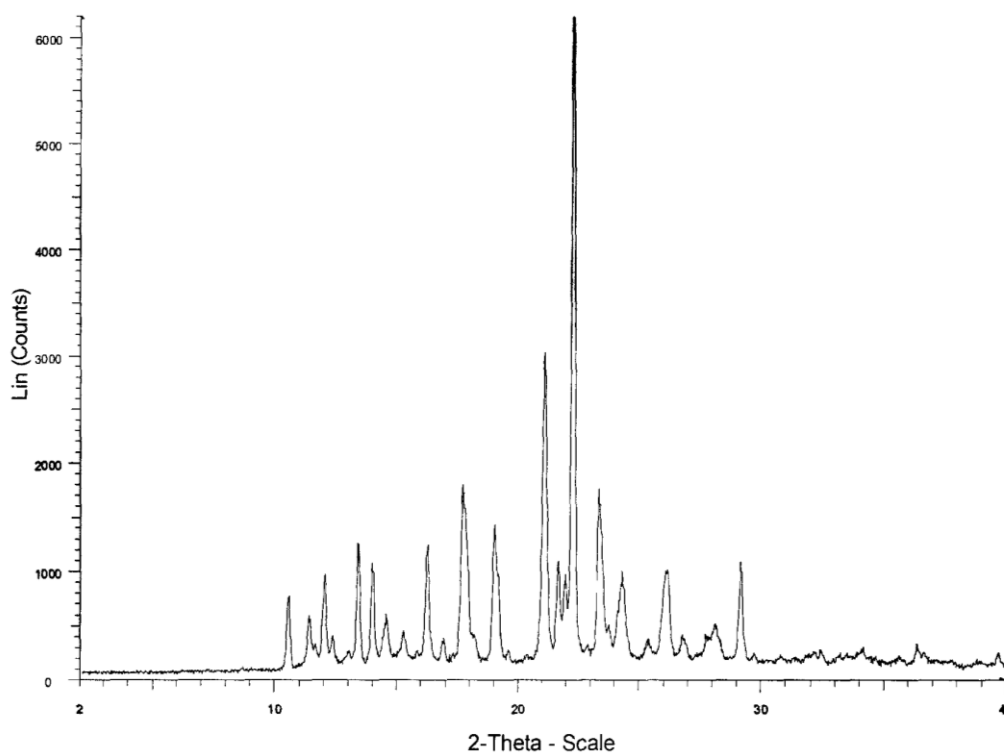
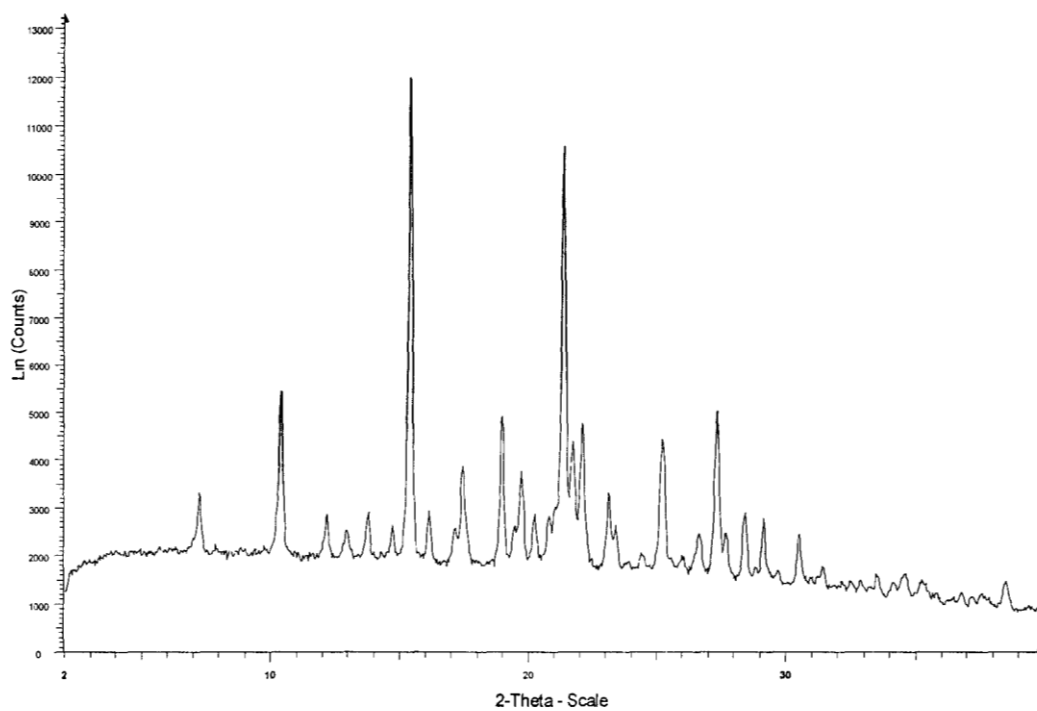
Сполука A має PF_{50} 200 nM як мінімум 20.

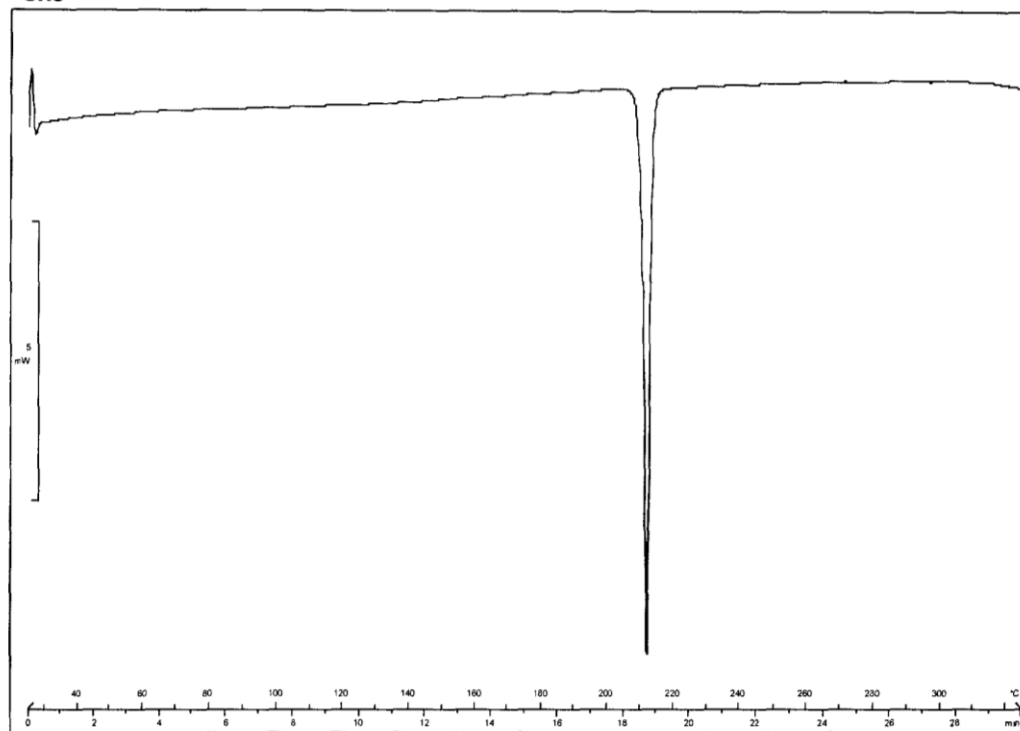
Фігура 1



Фігура 2



Φίγυρα 3**Φίγυρα 4**

Фігура 5 Δ_{exo} 

Lab: METTLER

STAR® SW 8.10

Комп'ютерна верстка Т. Чепелева

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601
