



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103610** (13) **C2**
(51) МПК**C07D 401/04** (2006.01)**A61K 31/506** (2006.01)**A61P 35/02** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

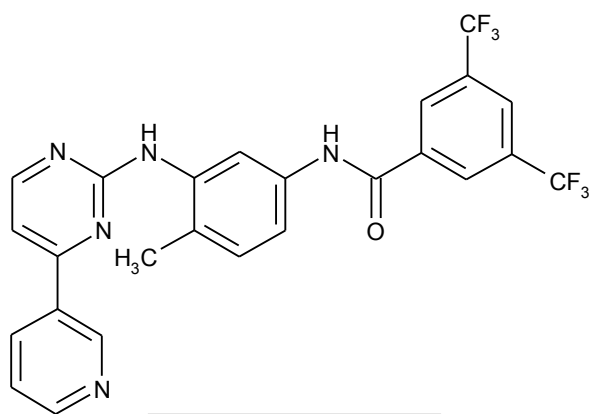
(21) Номер заявки:	а 2010 10597	(72) Винахідник(и):	Компелла Амала кішан (IN), Рачаконда Срінівас (IN), Адібхатла Калі Сатіа Бхуджанга Рао (IN), Венкаіах Човдарі Наннапанені (IN)
(22) Дата подання заявки:	02.03.2009	(73) Власник(и):	НАТКО ФАРМА ЛІМІТЕД, "Natco House", Road No. 2, Banjara Hills, Hyderabad, Andhra Pradesh 500 033, India (IN)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.11.2013	(74) Представник:	Льгова Майя Миколаївна, реєстр. №12
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	12/042,235, 12/042,247	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2006027795 (A1), 16.03.2006 PAQUETTE, L. (ED): "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis" 1995, WILEY, page 4893 CAIRA M. R.: "CRYSTALLINE POLYMORPHISM OF ORGANIC COMPOUNDS" TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 198, 1 January 1998, pages 163-208
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	04.03.2008, 04.03.2008		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2010, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.11.2013, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/IB2009/005421, 02.03.2009		

(54) КРИСТАЛІЧНА ФОРМА ПОХІДНИХ ФЕНІЛАМІНОПІРИМІДИНУ**(57) Реферат:**

Даний винахід стосується конкретної кристалічної форми (3,5-бістрифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), способів її одержання, фармацевтичних композицій, що містять дану кристалічну форму, і їхнього застосування як протипухлинного засобу в людини.

Сполука формули I, також відома як AN-019, являє собою: формулу (I)

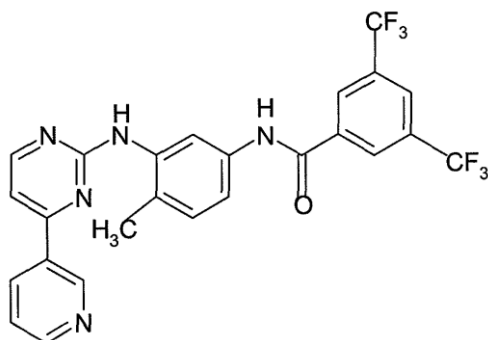
UA 103610 C2



Формула I
Код розробки AN-019

Галузь техніки

Даний винахід відноситься до конкретної форми (3, 5-біс-трифторметил)-N-[метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), до способів її одержання, фармацевтичним композиціям, що містять таку кристалічну форму, і їх застосуванню в якості протипухлинного засобу у людині. Сполука формули I, також відома як AN-019, являє собою:



Формула I
Код разработки: AN-019

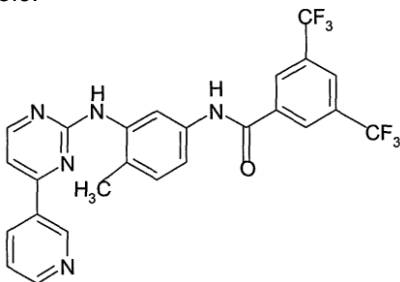
Рівень техніки, до якої відноситься винахід

Одержання (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду формули I і його застосування, особливо в якості протипухлинного засобу, описано в прикладах 3 і 4 WO2006/027795 (PCT/IN05/00243, поданої 19 липня 2005 року), яка опублікована 16 березня 2006 року, і у відповідних заявках багатьох інших країн, включаючи США (Pub. No.: US 2007/0232633). У цих публікаціях поліморфізм не розглянутий.

У даний час несподівано виявлено, що в певних умовах утворюється нова поліморфна форма сполуки формули I, яка надалі в даному описі описана як кристалічна форма III, і вона має переважні властивості.

Сутність винаходу

Даний винахід відноситься до конкретної форми (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), способам її одержання, фармацевтичним композиціям, що містять таку кристалічну форму, і до їхнього застосування в якості протипухлинних засобів у людини. Сполука формули I, також відома як AN-019, являє собою:



В одному з варіантів здійснення даний винахід відноситься до кристалічної форми III (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), яка має характеристики XRPD, наведені нижче в таблиці 3. Дана кристалічна форма може мати температуру плавлення 240°C або вище. Кристалічна форма може бути по суті чистою.

В одному з варіантів здійснення даний винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, що потребує антипроліферативну терапію. Даний варіант здійснення способу може включати введення суб'єктові кристалічної форми III (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), яка має характеристики XRPD, наведені нижче в таблиці 3.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичної композиції. Фармацевтична композиція містить фармацевтично прийнятний ексципієнт і кристалічну форму III (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), яка має характеристики XRPD, наведені нижче в таблиці 3.

Даний винахід також відноситься до застосування кристалічної форми III (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), яка має характеристики XRPD, наведені нижче в таблиці 1, для одержання

антипроліферативного лікарського засобу для лікування пухлинного захворювання.

Даний винахід відноситься до способу одержання кристалічної форми III (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл] бензаміду (формула I), яка має характеристики XRPD, наведені нижче в таблиці 3. Даний спосіб включає обробку
5 сполуки формули I у кристалічній формі I або II оцтовою кислотою або сумішшю диметилформаміду й ацетону, гексану або толуолу. Даний спосіб також може включати наступну обробку однократно обробленої сполуки оцтовою кислотою, ацетоном, гексаном або толуолом.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до кристалічної форми I (3,5-біс-трифторметил)-
10 N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), яка має характеристики XRPD, наведені нижче в таблиці 1.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до кристалічної форми II (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), яка має характеристики XRPD, наведені нижче в таблиці 2.

15 Короткий опис фігур.

На фіг.1 представлена діаграма рентгенівської дифракції (XRD) кристалічної форми I сполуки формули I. Значення 2θ і інтенсивності наведено в таблиці 1.

На фіг.2 представлена діаграма рентгенівської дифракції (XRD) кристалічної форми II сполуки формули I. Значення 2θ і інтенсивності наведено в таблиці 2.

20 На фіг.3 представлена діаграма рентгенівської дифракції (XRD) кристалічної форми III сполуки формули I. Значення 2θ і інтенсивності наведено в таблиці 3.

На фіг.4 представлена термограма диференціальної сканувальної калориметрії (DSC) кристалічної форми I сполуки формули I.

На фіг.5 представлена термограма диференціальної сканувальної калориметрії (DSC)
25 кристалічної форми II сполуки формули I.

На фіг.6 представлена термограма диференціальної сканувальної калориметрії (DSC) кристалічної форми III сполуки формули I.

На фіг.7 представлена морфологія кристалічної форми I сполуки формули I.

На фіг.8 представлена морфологія кристалічної форми II сполуки формули I.

30 На фіг.9 представлена морфологія кристалічної форми III сполуки формули I.

На фіг.10A і 10B проілюстровано, що внутрішньоочеревинні ін'єкції сполуки формули I (приклад 1) викликали регресію лейкозу в голих мишей. Мазки крові, узяті із хвостової вени, показали підвищення LGI у контролів і прогресуюче зниження LGI у мишей, оброблених імаїнобом і AN019 (фіг.10A). На 48 добу було визначено, що LGI у мишей, оброблених імаїнобом, склав 20 ± 5 , і LGI у мишей, оброблених AN019, склав 10 ± 2 із практично нормальним
35 числом клітин (фіг.10B).

На фіг.11 проілюстровано, що клітини, оброблені AN019, не показували будь-якого збільшення селезінки, у той час як у мишей, оброблених імаїнобом, спостерігалось збільшення селезінки (приклад 2).

40 На фіг.12 проілюстровано, що AN019 у концентрації 1 мг/кг не індукував зниження експресії люциферази, 5 мг/кг викликали фіксацію лейкозних клітин на постійних рівнях експресії, і концентрації 10 і 20 мг/кг викликали зниження експресії люциферази.

На фіг.13 проілюстровано, що пероральне введення імаїнобу (1, 5, 10 і 20 мг/кг) голим мишам, яким імплантували клітини лейкозу людини K562luc, приводило до регресії лейкозу при
45 більш високих концентраціях. Уведення імаїнобу в концентрації 1 мг/кг не індукувало зниження експресії люциферази, у той час як 10 мг/кг і 20 мг/кг показали вповільнення експресії люциферази.

Фіг.14A, 14B і 14C. На даних фігурах проілюстровані результати досліджень, аналогічних дослідженням, проілюстрованим на фігурах 12 і 13, але з використанням контрольного
50 лікарського засобу дасатинібу (приклад 16).

Фіг.15 і 16. Аналіз інвазії в матригель *in vitro* клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності зазначених концентрацій AN-019, AN-024 при опроміненні й без нього.

Фіг.17. Аналіз ангиогенезу *in vitro* клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності зазначених концентрацій AN-019, AN-024 при опроміненні й без
55 нього.

Фіг.18. Вестерн-Блот аналіз клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності зазначених концентрацій AN-019, AN-024 при опроміненні й без
60 нього.

Фіг.19. Експресія люциферази в мишей, яким імплантували K562luc, після обробки AN024,

AN019 або іматинобом.

Фіг.20. Кількість тварин, вилікуваних після обробки AN024 або AN019 на 58 добу. Обробку лікарським засобом припиняли на 42 добу, лікувальний вплив AN024 і AN019 у тварин тривало після припинення обробки лікарським засобом (дані, засновані на люмінесценції).

5 Фіг.21. Число бластних клітин у мазках крові, узятих у тварин на зазначену добу. Обробку лікарським засобом припиняли на 42 добу. AN024 і AN019 показали ефективність після припинення обробки лікарським засобом. Було виявлено, що іматиніб є неефективним.

Фіг.22. Напівкількісний аналіз внутрічерепних пухлин у голих мишей після введення TMZ, AN024 або AN019 з опроміненням або без нього (5Gly).

10 Фіг.23. Графічне подання голих мишей, що показують відсутність пухлин після обробки лікарським засобом AN-019, AN-024 з опроміненням або без нього.

Докладний опис винаходу

У таблиці 1 представлені значення 2θ і інтенсивності кристалічної форми I сполуки формули I з діаграми рентгенівської дифракції (XRD) фіг.1.

15

Таблиця 1 (форма I)

Угол [2- Тета]	Значение d Ангстрем	Интенсивность %
6.793	13.00131	13.9
9.823	8.99680	3.9
11.106	7.96069	54.2
13.267	6.66829	48.5
16.386	5.40523	7.0
17.941	4.94015	11.3
18.997	4.66785	13.0
19.778	4.48530	50,5
21.894	4.05635	100.0
22.396	3.96650	20.5
23.469	3.78750	19.7
24.466	3.63545	32.4
24.939	3.56759	52.6
25.525	3.48695	14.6
26.968	3.30351	10.3
28.777	3.09991	22.0
30.545	2.92436	14.8
33.011	2.71129	11.0

20 У таблиці 2 представлені значення 2θ і інтенсивності кристалічної форми II сполуки формули I з діаграми рентгенівської дифракції (XRD) фіг.2.

Таблица 2 (форма II)

Угол [2- Тета]	Значение d Ангстрем	Интенсивность %
6.500	13.58651	12.2
10.816	8.17295	100.0
12.094	7.31197	3.4
12.988	6.81061	49.7
16.120	5.49381	6.0
17.669	5.01562	10.9
19.521	4.54367	41.7
21.675	4.09687	39.9
22.083	4.02198	17.1
23.230	3.82602	21.9
24.264	3.66523	17.8
24.639	3.61023	8.5
28.460	3.13371	4.8
29.328	3.04290	2.3
30.256	2.95165	4.1
32.746	2.73261	3.5
34.035	2.63201	3.1
35.590	2.52050	1.5
39.660	2.27072	1.9
42.123	2.14346	2.5
44.193	2.04777	1.7

У таблиці 3 представлені значення 2θ і інтенсивності кристалічної форми III сполуки формули I з діаграми рентгенівської дифракції (XRD) фіг.3.

5

Таблица 3 (форма III)

Угол [2- Тета]	Значение d Ангстрем	Интенсивность %
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8

16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

Кристалічна форма III сполуки формули I характеризується голкоподібними кристалами. Кристалічні форми I і II сполуки формули I характеризуються неголкоподібними кристалами.

Кристалічні форми I і II сполуки формули I є метастабільними при кімнатній температурі. Однак кристалічна форма III сполуки формули I є термодинамічно стабільною при кімнатній температурі. Це вказує на високу стабільність кристалічної форми III.

Таким чином, в одному з варіантів здійснення даний винахід відноситься до кристалічної форми III сполуки формули I, яка є стабільною при кімнатній температурі й навіть при більш високих температурах (наприклад, 120°C) і в умовах збільшеного навантаження, і має характеристики, наведені в таблиці 3 (вище).

В одному з варіантів здійснення даний винахід відноситься до способу одержання кристалічної форми III сполуки формули I, яка є стабільною й має характеристики, наведені в таблиці 3.

У таблиці 4 представлена стабільність при нагріванні кристалічної форми III при температурах 110-140°C. Було показано, що форма III не є метастабільною й стабільна при нагріванні до 130°C протягом 6 годин.

Чисту кристалічну форму III (1 г), отриману за способом даного винаходу, поміщали в трубку для кип'ятіння й поступово нагрівали на масляній бані. Потім речовину досліджували XRPD. Результати представлено в таблиці 4.

Таблиця 4

Вміст поліморфа* до нагрівання	Температура	Час нагрівання (години)	Поліморфна форма, виявлена* після нагрівання
Форма III	110°	6	Форма III
Форма III	120°	6	Форма III
Форма III	130°	6	Форма III

* Наявність форм I і II у даних зразках була нижче рівня детекції.

Отримані дані демонструють, що кристалічна форма III не була метастабільною. Кристалічна форма III була стабільною при нагріванні навіть при 130°C протягом 6 годин.

У таблиці 5 представлена стабільність кристалічної форми III в умовах збільшеного навантаження (45±2°C, 75±5% RH, 6 місяців) у сипучій і в капсульованій формі.

Таблиця 5

Стабільність кристалічної форми III у сипучій і в капсульованій формі

Вміст поліморфа* сполуки формули I у виготовленій капсулі	Вміст поліморфа* сполуки формули I у сипучій формі	Тривалість зберігання (місяці) при 40±2°C/75±5% RH
Виявлена поліморфна форма	Виявлена поліморфна форма	
Форма III	Форма III	0 місяць
Форма III	Форма III	1 місяць
Форма III	Форма III	2 місяця
Форма III	Форма III	3 місяця
Форма III	Форма III	6 місяців

* Наявність форм I і II у даних зразках була нижче рівня детекції.

Отримані дані демонструють, що форма III не перетворюється в інші форми із часом. Таким чином, була встановлена стабільність форми III у сипучій і в капсульованій формі.

5 В одному з варіантів здійснення даний винахід відноситься фармацевтичної композиції, корисної при терапії пухлини, що містить стабільну кристалічну форму III сполуки формули I.

Дозована форма композиції, що містить стабільну кристалічну форму III, яку можна одержувати способом даного винаходу, наприклад, пероральна дозована форма, може являти собою капсулу, що містить композицію, наприклад, порошкову або гранульовану тверду композицію, або у твердій, або в м'якій оболонці. Оболонка може бути виготовлена з желатину, який необов'язково містить пластифікатор, такий як гліцерин або сорбіт, і агент, що надає непрозорість, або барвник.

10 Способи, відомі в даній галузі, можна використовувати для одержання фармацевтичної композиції, що містить кристалічну форму III, у формі капсул. Екципієнти, які можна використовувати, включають мікрокристалічну целюлозу, полоксамер 407, кросповідон XL, Aerosil, SLS, стеарат магнію або їх суміші.

15 У таблиці 6 представлені підходящі кількості активних інгредієнтів і екципієнтів (% мас.) для фармацевтичних сполук даного винаходу.

Таблиця 6

Варіант отримання фармацевтичної композиції, що має кристалічну форму III

№. Речовини	Матеріал	Композиція (мас./мас.), мг/капсула
1.	Сполука формули I, III	25,0
2.	Мікрокристалічна целюлоза	8,0
3.	Полоксамер 407	12,5
4.	Кросповідон XL	12,5
5.	Стеарат магнію	0,5
6.	SLS	4,0
7.	Аеросіл	0,25

20

В одному з варіантів здійснення винахід відноситься до конкретної по суті чистої кристалічної форми III (3,6-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіридин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I). Термін "по суті чистий" у контексті даного винаходу означає, що приблизно від 90 до 100% мас., приблизно від 95 до 100% мас., або, наприклад, 25 приблизно від 99 до 100% мас. кристалів формули I присутні в кристалічній формі даного винаходу, наприклад, кристалічній формі III.

У контексті формулювання, кристалічна форма III формули I показує діаграму рентгенівської дифракції по суті як на фіг.3, термін "по суті" означає, що присутні щонайменше основні лінії діаграми, наведеної на фіг.3, тобто лінії, що мають відносну інтенсивність більш 10%, особливо більш 20%, у порівнянні з найбільш інтенсивною лінією в діаграмі.

30 Кристалічні форми мають наступні властивості:

Температура плавлення в кросповідон DSC кристалічної форми III становить 246,7°C. Температура плавлення в термограмі DSC кристалічної форми I становить 234°, і кристалічної форми II становить 240,47°C, 249,2°C(пік).

5 Діаграми рентгенівської дифракції також демонструють інші виражені відмінності. В одному з варіантів здійснення по суті чиста кристалічна форма III сполуки формули I має діаграму рентгенівської дифракції, зазначену на фіг.3.

В одному з варіантів здійснення винахід відноситься до кристалічної форми III сполуки формули I, яка характеризується наявністю кристалів, що мають форму, представлену на фіг.9, наприклад, кристалічну форму III у по суті чисту форму.

10 В одному з варіантів здійснення кристалічна форма III сполуки формули I має температуру плавлення більш 240°C, наприклад, від 245 до 250°C.

Кристалічну форму III (наприклад, по суті чисту) можна одержати в такий спосіб: обробкою іншої кристалічної форми, наприклад, кристалічної форми I або II, сполуки формули I полярним розчинником, що підходить, наприклад, N,N-ди-нижчий алкіл-нижчим алканкарбоксамідом, таким як N,N-диметилформамід або N,N-диметилацетамід, або, наприклад, аліфатичною карбоною кислотою, такою як оцтова кислота, або сумішшю зазначених вище сполук з кетоном, таким як ацетон, або гідрофобним вуглеводнем, наприклад, толуолом або гексаном, або їх сумішшю, при підходящій температурі.

20 В одному з варіантів здійснення сполуку формули I обробляють сумішшю диметилформаміду й ацетону з наступною обробкою ацетоном. В одному з варіантів здійснення сполуку формули I обробляють сумішшю диметилформаміду й гексану з наступною обробкою гексаном. В одному з варіантів здійснення сполуку формули I обробляють сумішшю диметилформаміду й толуолу з наступною обробкою толуолом. В одному з варіантів здійснення сполуку формули I обробляють один або кілька раз оцтовою кислотою. У цьому контексті, 25 "проведення обробки" або "обробка" відноситься до нагрівання, охолодження, кип'ятіння зі зворотним холодильником, промивання, суспендуванню або подібному, у розчиннику або суміші розчинників. Кожний із зазначених варіантів здійснення приводить до кристалічної форми III сполуки формули I.

У певних варіантах здійснення спосіб одержання кристалічної форми III за даним винаходом 30 не включає обробку іншої кристалічної форми сполуки формули I хлороформом, метанолом, дихлорметаном, простим ефіром (наприклад, діетиловим ефіром), водою, етилацетатом або їх сумішшю. У певних варіантах здійснення кристалічну форму III не одержують обробкою іншої кристалічної форми сполуки формули I хлороформом, метанолом, дихлорметаном, простим ефіром (наприклад, діетиловим ефіром), водою, етилацетатом або їх сумішшю.

35 Кристалічна форма III сполуки формули I, а також інші форми, мають підходящі фармакологічні властивості, і їх можна використовувати, наприклад, у якості протипухлинних засобів.

Також даний винахід відноситься до способу одержання сполуки формули I. Даний спосіб може включати:

40 надання сполуки формули VI, 3,5-біс-трифторметилбензоїлхлориду; або одержання даної сполуки відомими способами;

конденсацію 4-метил-3-нітроаніліну зі сполукою формули (IV) при приблизно від 0 до приблизно -10°C у хлорвуглеводневому розчиннику з додаванням основної сполуки, з одержанням сполуки формули III, ((3,5-біс-трифторметил)-N-(4-метил-3-нітрофеніл))бензаміду;

45 відновлення сполуки формули (III) хлоридом олова (II)/концентрованої HCl при температурі кипіння зі зворотним холодильником протягом приблизно від 0,5 до приблизно 1 години, з одержанням сполуки формули IV, (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-аміно-4-метилфеніл))бензаміду;

конденсацію сполуки формули IV з водяним розчином ціанаміду при температурі кипіння зі зворотним холодильником у н-бутанольному розчиннику, з одержанням сполуки формули V, 50 (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-гуанідино-4-метилфеніл))бензаміду;

конденсацію сполуки формули (V) з 3-диметиламіно-1-піридин-3-іл-пропеноном у присутності основи при температурі кипіння зі зворотним холодильником, з одержанням сполуки формули (I).

В одному з варіантів здійснення спосіб здійснюють, як описано в прикладі 10.

55 Опис патентної заявки США No. 11/714565, поданої 5 березня 2007 року (публікація США No. US 2007/0232633, опублікована 4 жовтня 2007 року) і заявки PCT No. PCT/IN 2005/000243, поданої 19 липня 2005 року (публікація PCT No. WO2006/027795, опублікована 16 березня 2006 року) включені в даний опис за допомогою посилань у всій їхній повноті.

60 Варіанти здійснення даного винаходу описані в прикладах, наведених нижче, які надані тільки для ілюстрації винаходу й, таким чином, їх не слід витлумачувати, як такі, що обмежують

об'єм винаходу.

Приклади

Загальний коментар

Виявлено, що основна сполука даного винаходу формули I (зазначена за допомогою коду розробки AN-019), має корисну протипухлинну активність, що перевершує деякі з існуючих схвалених лікарських засобів цього класу. Виявлено, що дана сполука володіє трьома різними поліморфними формами I, II і III, як обговорювалося вище. Незважаючи на те, що всі форми мають цінні фармакологічні властивості, і їх можна використовувати в якості протипухлинних засобів, форма III була обрана для оцінки біологічної активності, виходячи з її термодинамічної стабільності. Код розробки AN-024 відноситься до іншої сполуки того ж класу, описаному авторами даного винаходу в іншому місці. Біологічну ефективність і активність сполук даного винаходу порівнювали зі схваленими лікарськими засобами, такими як іматинобу мезилат і дасатиніб, щоб вони служили як позитивні контролі в даному дослідженні. "Іматинобу мезилат" скорочують і позначають у даному дослідженні як "імаїніб".

Приклад 1 - Установлення активності AN-019 проти CML у голих мишей, яким імплантували клітини K562 (фіг. 10A і 10B)

Для визначення активності сполук даного винаходу проти CML, клітини K562 одержували від ATCC і ці клітини імплантували голим мишам. У якості контролю для порівняння використовували імаїніб у тій же концентрації на кг маси тіла. Обробку лікарським засобом починали через 15 діб після імплантації й продовжували до 48 діб за допомогою внутрішньоочеревинних ін'єкцій 10 мг/кг раз на добу. Кров відбирали із хвостової вени кожні 6 діб, визначали відсоток клітин K562 і обчислювали процентний індекс росту лейкозу (LGI).

У мишей, оброблених AN019, спостерігалася стійке зниження LGI після початку обробки лікарським засобом. LGI для мишей, оброблених імаїнобом, також показав зниження, але значно відстає від мишей, оброблених AN019. Через сорок вісім діб після постійних внутрішньоочеревинних ін'єкцій, миші, оброблені AN019, були порівнянні з нормальними контрольними мишами, і в мишей, оброблених імаїнобом, LGI становив 20 ± 5 у порівнянні з контролем. Імуногістохімія селезінки на білок Crk виявила локалізацію клітин K562 у селезінці контрольних мишей. У мишей, оброблених AN019, спостерігалися базальні рівні експресії Crk, у той час як у мишей, оброблених імаїнобом, спостерігалася менша кількість колоній від низьких до таких, що не піддаються детекції рівнів експресії Crk.

Способи

Імплантація K562

Голим мишам (nu/nu) імплантували клітини K562 (1×10^6) через хвостову вену. Використовували чотири миші на групу і їх розділяли на 4 групи. У трьох групах імплантували клітини K562 і одну групу використовували як нормальних контролів. Групу 2 інокулювали клітинами K562, і вона служила в якості позитивних контролів без уведення. Дві інші групи, яким імплантували клітини K562, обробляли або імаїнобом, або AN019.

Внутрішньоочеревинна ін'єкція AN019 і імаїнобу

Мишей, яким імплантували K562, обробляли або імаїнобом, або AN019 (10 мг/кг маси тіла) за допомогою внутрішньоочеревинних ін'єкцій. Вихідні розчини імаїнобу й AN019 одержували в концентрації 100 мг/мл у ДМСО. Мишам робили ін'єкції зазначених вище дозувань внутрішньоочеревинним шляхом. Було визначено, що середня маса голих мишей становить 30 ± 3 г, і було обчислено, що дозування на мишу становить 300 ± 30 мг/миша. Три мікролітри вихідних розчинів розводили до 100 мкл стерильною водою безпосередньо перед внутрішньоочеревинними ін'єкціями. Внутрішньоочеревинні ін'єкції проводили раз на добу починаючи з 15 доби після імплантації до 48 доби, усього проводячи 33 ін'єкції.

Визначення індексу росту лейкозу (LGI)

Індекс росту лейкозу визначали з використанням формули $LGI (\%) = (V_0 - V_t) / V_c \times 100\%$. V_c означає середню кількість бластних клітин (K562) на мл крові в контрольних тварин у певний час виміру, і V_t означає середню кількість бластних клітин на мл крові в тестуємих тварин у певний час виміру. Відбір крові в мишей (оброблених і неопрацьованих) проводили на шосту добу після імплантації клітин K562 і продовжували з інтервалом кожні шість діб протягом 48 діб. Відбір крові проводили через хвостову вену. Кількісний аналіз LGI представляли графічно.

Імуноцитохімія

Контрольних мишей умертвляли на 42 добу, коли спостерігали вторинні симптоми лейкозу, такі як збільшення живота й відсутність кровотоку в периферичних судинах, що приводить до втрати пальців і червоним плямам під поверхнею шкіри. Селезінку й будь-які вторинні пухлини витягали, фіксували у формальдегіді й занурювали в парафін у відповідності зі стандартними протоколами. Одержували парафіновий зріз і обробляли його для імуноцитохімії. Регідратовані

зрізи обробляли 0,3% H_2O_2 для інактивації будь-яких нативних пероксидаз перед імунологічним дослідженням. Зрізи блокували стерилізованим фільтрацією (0, 22-мкм фільтр) 1% BSA-PBS при кімнатній температурі протягом 1 год. Після блокування зрізи піддавали імунозондуванню зі специфічним проти Crk людини первинним моноклональним антитілом, індукованого в кролика, проти синтетичного пептиду, відповідного до залишків в SH2 домені близько N-кінця білка Crk людини (Abeam, Cambridge, MA, USA) в 1% BSA-PBS протягом ночі. Вторинне антитіло (антитіло проти антитіл кролика), кон'юговане з HRP, використовували для детекції наявності первинного антитіла. Зрізи швидко промивали три рази в розчині PBS після імунозондування вторинним антитілом, і додавали субстрат HRP DAB згідно з інструкціями виготовлювача (Sigma St Louis MO USA). Реакції давали можливість протікати доти, поки не спостерігався чіткий контраст між позитивними й негативними контролями. Для негативних контролів первинне антитіло видаляли. Селезінка мишей з лейкозом служила в якості позитивних контролів.

Результати

Внутрішньоочеревинні ін'єкції AN019 викликали регресію лейкозу в голих мишей. Мазки крові, які одержували кожні шість діб після імплантації, показали підвищення LGI у контрольних мишей у порівнянні з мишами без уведення. Мазки крові, узяті із хвостової вени, показали підвищення LGI у контролів і прогресуюче зниження LGI у мишей, оброблених іматинобом і AN019 (фіг.10A). Починаючи з п'ятнадцятої доби після імплантації, мишам проводили внутрішньоочеревинні ін'єкції AN019 або іматинобу в дозуванні 10 мг/кг маси тіла. Миші, оброблені іматинобом, відставали від мишей, оброблених AN019, у кожний момент часу. На 48 добу було визначено, що LGI мишей, оброблених іматинобом, становить 20 ± 5 , у той час як було виявлено, що LGI мишей, оброблених AN019, становить 10 ± 2 із практично нормальною кількістю клітин (фіг.10B).

Приклад 2 - Ін'єкції AN019 голим мишам, яким імплантували клітини K562, не показали збільшення селезінки й експресії Crk (фіг.11)

Голим мишам, яким імплантували клітини K562, вводили іматиніб або AN019 внутрішньоочеревинними ін'єкціями. Після того, як спостерігали зниження LGI, мишей умертвляли й селезінку витягали. Збільшення селезінки спостерігали при макроскопічному дослідженні, і було визначено, що в контрольних мишей селезінка була збільшеною, що вказує на локалізацію клітин K562. Клітини, оброблені AN019, не показали будь-якого збільшення селезінки, у той час як у мишей, оброблених іматинобом, селезінка була трохи збільшена (фіг.11). Парафінові зрізи селезінки, піддані імунозондуванню відносно наявності білка Crk, показали виражену локалізацію експресії Crk, що супроводжується підвищеною клітинною щільністю, що вказує на локалізацію K562 у контрольних мишей. У мишей, оброблених AN019, спостерігався тільки базальний рівень експресії Crk, порівняний з негативним контролем. У мишей, оброблених іматинобом, спостерігалися локалізовані області експресії Crk, що вказують на клітини K562 у селезінці. У контрольних мишей також розвивалися випадковим образом розташовані підшкірні пухлини, що демонструють експресію Crk, що вказувало на присутність клітин K562.

С отриманих результатів, мабуть, що введення AN019 викликало регресію LGI у голих мишей. У мишей, оброблених іматинобом, також спостерігалось значиме зниження LGI, але воно відставало від зниження в мишей, оброблених AN019. Миші, оброблені як AN019, так і іматинобом, не мали фізіологічних, фенотипічних або поведінкових відхилень. У контрольних мишей спостерігалася наявність випадковим чином розташованих підшкірних пухлин із втратою пальців, що супроводжується червонуватими плямами під шкірою й невеликим збільшенням живота. С отриманих результатів очевидно, що AN019 являє собою перспективний лікарський засіб для лікування лейкозу.

Приклад 3 - Дослідження *in vivo* з використанням клітинних ліній CML миші Baf3, стійких до іматинібу

Для визначення *in vivo* протилейкозної активності AN019 і AN024, голим мишам внутрішньоочеревинно імплантували клітини лейкозу миші Baf3 (Wt, T315I, M351T і E225K), і через 15 діб після імплантації мишей обробляли іматинобом (10 мг/кг), AN019 (20 мг/кг) і AN024 (20 мг/кг) шляхом пероральної примусової годівлі або внутрішньоочеревинних ін'єкцій. Мазки крові одержували через хвостову вену або через стегову вену кожні 6 діб, проводили підрахунок бластних клітин і одержували його графічне зображення.

Мазки крові мишей, яким імплантували Baf3Wt і обробляли іматинобом (10 мг/кг), AN019 (20 мг/кг) або AN024 (20 мг/кг), були подібними з нормальними контролями через 42 доби.

Мазки крові мишей, яким імплантували Baf3T315I і вводили іматиніб (10 мг/кг), AN019 (20 мг/кг) або AN024 (20 мг/кг), показали значиме зниження кількості бластних клітин у випадку мишей, оброблених AN024 і AN019. У мишей, оброблених пероральним дозуванням іматинобу,

не спостерігалось зниження кількості бластних клітин, і воно було подібним з контролем без уведення й мишами, яким імплантували Baf3M351T.

Миші, яким імплантували Baf3E255K, також мали подібну поведінку з мишами, яким імплантували Baf3M351T і Baf3T3151.

Голих мишей, яким імплантували мутантні клітини Baf3 Wt, E255K, T3151 і M351T, обробляли іматинобом, AN019 і AN024 (перорально й внутрішньоочеревинно). Мишам вводили іматиноб (10 мг/кг), AN019 (20 мг/кг) і AN024 (20 мг/кг) примусовою пероральною годівлею або внутрішньоочеревинними ін'єкціями через 15 діб після імплантації. Моніторинг збільшення живота й зниження активності проводили щодоби, кожні 6 діб брали мазки крові із хвостової вени або стегнової вени й фарбували їх H&E згідно зі стандартними протоколами. Через 42 доби після імплантації, мишей умертвляли й селезінку витягали. Визначали збільшення селезінки й зіставляли її з кількістю бластних клітин у мазках крові.

Результати

Мікроскопічне визначення кількості бластних клітин

У мишей, яким імплантували клітини Baf3, кожні 6 діб до 42 діб відбирали кров із хвостової вени або стегнової вени. На 15 добу після імплантації, мишей обробляли іматинобом, AN019 і AN024 (перорально й внутрішньоочеревинно), як описано вище. Було виявлено, що у мишей, яким імплантували Baf3Wt, при всіх умовах уведення спостерігалось прогресуюче зниження кількості бластних клітин. Baf3M351T, T3151 і E225K погано відповідали на обробку іматинобом. Пероральне введення іматинобу не мало істотного впливу на мишей, яким імплантували Baf3M351T, T3151 і E225K. У цілому, внутрішньоочеревинне введення AN024 і AN019 було значно краще відносно зниження кількості бластних клітин у всіх мишей, яким імплантували Baf3.

Обробка AN019 мишей, яким імплантували Baf3Wt, індукувала повну регресію лейкозних бластних клітин, і вони були порівнянні з контролем без уведення. Внутрішньоочеревинне введення перевершувало пероральне введення. Обробка AN019 мишей, яким імплантували Baf3 M351T, T3151 і E225K, показала значиме зниження кількості бластних клітин, і на 42 добу вони були порівнянні з мишами, яких на 12 добу після імплантації піддавали обробці; миші, яким проводили внутрішньоочеревинне введення, продемонстрували більшу регресію бластних клітин, ніж миші, яким проводили пероральне введення. Обробка AN024 мишей, яким імплантували Baf3 M351T, T3151 і E225K, продемонструвала значиме зниження кількості бластних клітин, і вона перевершувала обробку AN019 на 42 добу; у мишей, яким проводили внутрішньоочеревинне введення, спостерігалась більша регресія бластних клітин, ніж у мишей, яким проводили пероральне введення.

Приклад 4 - Відповідь голих мишей, яким імплантували лейкозні клітини людини K562 normal/luc, з низькою дозою AN024, AN019 і іматинобу (фіг.12 і 13)

Голим мишам (nu/nu) імплантували клітини K562 (1×10^6) normal/luc через хвостову вену. Використовували за п'ять мишей на групу і їх підрозділяли на 24 групи+2 контролю. Усім групам імплантували клітини K562 normal/luc. С 24 груп, 12 використовували для досліджень люциферази, у той час як інші 12 використовували для досліджень із підрахунком у мазках крові.

Пероральне введення AN019, AN024 і іматинобу

Лікарські засоби вводили за допомогою примусової пероральної годівлі (2% гуміарабік і 2% SLS у водній суспензії).

Результати

Пероральне введення AN019 (1, 5, 10 і 20 мг/кг) голим мишам, яким імплантували лейкозні клітини людини K562luc, привело до регресії лейкозу при більш високих концентраціях. Концентрація AN019 1 мг/кг не індукувала зниження експресії люциферази, у той час як концентрація 5 мг/кг викликала фіксацію клітин лейкозу на постійних рівнях експресії, і концентрації 10 і 20 мг/кг викликала зниження експресії люциферази (фіг.12). Пероральне введення іматинобу (1, 5, 10 і 20 мг/кг) голим мишам, яким імплантували лейкозні клітини людини K562luc, приводило до регресії лейкозу при більш високих концентраціях. Уведення іматинобу в концентрації 1 мг/кг не індукувало зниження експресії люциферази, у той час як 10 мг/кг і 20 мг/кг показали вповільнення експресії люциферази (фіг.13).

Дане дослідження демонструє перевагу AN-019 над іматинобом відносно регресії лейкозу, зокрема, через 24 доби після введення.

Приклад 5 - Визначення ефективності лікарського засобу (De) і визначення проникності для лікарського засобу із часом

Визначення ефективності лікарського засобу (De)

Ефективність лікарського засобу визначали з використанням рівняння,

$$De = \left[\frac{\sum_{i=1}^N \frac{A_i}{C_i} - \frac{\sum_{i=1}^N A_i}{\sum_{i=1}^N C_i} \right] \div \sum_{i=1}^N \frac{A_i}{C_i} \times 100$$

де:

$\sum_{i=1}^N$ означає загальну кількість живих мишей при даній концентрації наприкінці експерименту, помножене на кількість фотонів, $\sum_{i=1}^N C_i$ означає загальну кількість живих мишей, що демонструють експресію люциферази при даній концентрації наприкінці експерименту, і $\sum_{i=1}^N A_i$ означає кількість контрольних тварин без уведення, помножене на кількість фотонів, і $\sum_{i=1}^N \frac{A_i}{C_i}$

означає вихідну кількість тварин у контрольній групі на початку експерименту, помножене на кількість фотонів. Результати були представлені графічно як відсоток ефективності лікарського засобу (таблиця 7).

Результати

У таблиці 7 представлена ефективність лікарського засобу при різних концентраціях іматинобу, AN019 і AN024, при визначенні в дослідженнях *in vivo*. З таблиці 7 очевидно, що AN019 є дозозалежним, у той час як іматиніб і AN024 не є дозозалежними, і вони були ефективними в низьких концентраціях.

Таблиця 7

Лікарський засіб	5 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг
Іматиніб De	10,00	32,00	13,33	8,00
AN019 De	25,82	78,20	83,40	85,20
AN024 De	30,00	85,00	87,00	90,00

Визначення проникності для лікарського засобу із часом (T_p)

Проникність із часом обчислювали з використанням наступного рівняння,

$$T_p = \frac{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_{ter}}{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_b}$$

де:

P означає кількість фотонів на добу "a", доба "ter" або на добу "b", де "a" означає добу, коли обробку лікарським засобом припиняли, "ter" означає добу, коли експеримент завершували, і "b" означає добу, коли P було мінімальним після доби a, але до доби "ter".

n дорівнює числу живих тварин під час виміру P.

Більше значення вказує на високу ефективність лікарського засобу після припинення обробки лікарським засобом, тобто проникність для лікарського засобу із часом.

Результати

Для визначення проникності із часом для AN019, AN024 і іматинобу, голим мишам імплантували клітини K562luc. Тварин після трансплантації фотографували з інтервалами 6 діб. Обробку лікарським засобом (AN019 20 мг/кг, AN024 20 мг/кг і іматинобом 10 мг/кг) починали через 15 діб після імплантації за допомогою внутрішньоочеревинних уведень раз на добу. Обробку лікарським засобом припиняли на 35 добу, тварин фотографували до 45 доби, і проводили обчислення, як описано в способах.

С використанням рівняння для проникності із часом, були визначені наступні значення T_p :

AN019=2,0

AN024=2,4

Іматиніб=0,8

Значення T_p указують на те, що AN024 мав активність вище контролю без обробки й був значно краще, чим AN019, відносно активності із часом після припинення обробки лікарським засобом.

Приклад 6 - Ефект дасатинібу в голих мишей, яким імплантували Baf3, у порівнянні з AN024, AN019 і іматинобом (фіг.14A, 14B і 14C)

У прикладі 3 показана ефективність AN024 і AN019 для лікування лейкозу в порівнянні з іматинобом з використанням мутантних клітинних ліній Baf3 (wt, T315I, M351T і E255K). У цьому випадку, автори даного винаходу використовували дасатиніб у якості контрольного лікарського засобу для визначення відповіді мутантних клітин Baf3 на введення, у порівнянні з AN019,

AN024 і іматинобом.
Спосіб

Схема експерименту наведена нижче у формі таблиці:

	Уведення ↓, імплантована клітинна лінія →	Wt	T3151	M351T	E255K
Контролі, (виконано раніше)					
Дасатиніб (10 мг/кг)	Перорально	5	5	5	5
	Внутрішньоочеревинно	5	5	5	5

5 Голим мишам внутрішньоочеревинно імплантували мутантні клітини Baf3 (wt, T3151, M351T або E255K). Через 15 діб після імплантації, мишам вводили або перорально, або внутрішньоочеревинно 10 мг/кг дасатиніб протягом 27 діб. Кожні 6 діб відбирали кров зі стегнової вени або хвостової вени, визначали кількість бластних клітин і його графічно зображували.

10 Результати

На 6 добу, мазки крові голих мишей, яким імплантували мутантні клітини Baf3 (wt, T3151, M351T або E255K), продемонстрували нормальну кількість бластних клітин, і кількість бластних клітин поступово зростала, як спостерігали на 12 добу. Уведення дасатинібу починали на 15 добу після імплантації. Уведення дасатинібу давало результати не кращі, чим введення іматинобу. На 42 добу, при завершенні експерименту, миші, яким імплантували клітини wt, продемонстрували виражену відповідь на дасатиніб, що вказує на те, що внутрішньоочеревинне введення перевершувало пероральне. Миші, яким імплантували T3151 і M351T, були подібні з контролем без значимого зниження кількості бластних клітин. У мишей, яким імплантували E255K, результати були трохи кращими, чим у випадку імплантованих клітин T3151, у відповідь на введення дасатинібу. Загалом, введення дасатинібу приводило тільки до вповільнення прогресування лейкозу без значимого лікувального ефекту. Кількість бластних клітин було значно більш низьким у групі, який вводили AN019. Отримані результати проілюстровано на фігурах 14A, 14B і 14C.

25 Приклад 7 - Дослідження in vitro на клітинних лініях гліоми й рака молочної залози (фіг.15-18)

Матеріали й способи

Для визначення ефекту AN019, AN024 і темозоломідом з опроміненням або без нього на клітини гліоми й рака молочної залози, клітини обробляли конкретними дозами й визначали інвазію, ангиогенез і зміни певних молекул передачі сигналу.

30 Аналіз інвазії в матригелю

Інвазивність in vitro клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій сполук оцінювали з використанням модифікованого аналізу в камері Бойдена. Клітини обробляли даними сполуками протягом 48 год. 1×10^6 клітин суспендували в 600 мкл безсироваткового середовища, доповненого 0,2% BSA і поміщеного у верхнє відділення камер transwell oC orning Costar Fischer Scientific, каталожний #07-200-158, Pittsburgh PA), покритих матригелем (0,7 мг/мл). Нижнє відділення камери заповнювали 200 мкл сироваткового середовища й кліткам давали можливість мігрувати протягом 24 год. Після інкубації клітини фіксували, фарбували Нема-3 і кількісно визначали, як описано раніше (Mohanam et al. 1993). клітини, що мігрували, візуалізували під мікроскопом для визначення зниження інвазивності, індукованої сполуками даного винаходу.

Аналіз ангиогенезу

45 Ангиогенез in vitro клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій сполук визначали в такий спосіб. Клітини (2×10^4 /лунка) висівали на предметні стекла з 8-ямковими камерами й обробляли різними концентраціями тестуємих сполук. Після інкубації протягом 24 год, кондиціоновані середовища видаляли й додавали до 4×10^4 ендотеліальних клітин дерми людини (моношар у предметних стеклах з 8-ямковими камерами), ендотеліальним кліткам дерми людини давали можливість рости протягом 72 год. Потім клітини фіксували в 3,7% формальдегіді, фарбували H&E і фотографували.

50 Вестерн-Блот аналіз

Вестерн-Блот аналіз клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій сполук оцінювали у відповідності зі стандартними протоколами. Клітини обробляли AN019, AN024 або темозоломідом у певних концентраціях.

Через 24 год послу обробки, клітини збирали й клітинні лизати екстрагували. Рівні кількості білків фракціонували за допомогою SDS-PAGE. Фракціоновані білки піддавали блоттингу на нейлонові мембрани й імунозондували на AKT, ERK і Pi3k. Виділені білки клітин рака молочної залози, крім того, імунозондували на EGFR, ErbB1, ErbB2 і ErbB3.

5 Результати

Аналіз інвазії в матригелю

Інвазивність in vitro клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій сполук оцінювали з використанням модифікованого аналізу в камері Бойдена. Клітини обробляли даними сполуками протягом 48 год. У таблиці 2 представлені результати досліджень in vitro в аналізі інвазії в матригелі клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій сполук, при опроміненні й без нього.

Зміна інвазивності різних клітинних ліній наведена в таблиці 8. З аналізу інвазії очевидно, що AN019 і AN024 були найбільш ефективними у відношенні інгібування інвазії більшості клітин, як при опроміненні, так і без нього.

Таблиця 8

Клітинна лінія	Лікарський засіб	- Опромінювання % інвазії	+ Опромінювання % інвазії	± Змінення інвазії після опромінення
ZR-71	Темозоламід	70%	65%	-5%
	AN024	48%	45%	-3%
	AN019	33%	19%	-14%
MDA-MB-231	Темозоламід	62%	49%	-13%
	AN024	43%	47%	+4%
	AN019	45%	15%	-30%
4910	Темозоламід	95%	73%	-22%
	AN024	56%	39%	-17%
	AN019	42%	15%	-27%
5310	Темозоламід	50%	63%	+13%
	AN024	27%	32%	+5%
	AN019	5%	6%	+1%
U87	Темозоламід	90%	93%	+3%
	AN024	53%	29%	-24%
	AN019	18%	18%	0%

На фіг.15 і 16 проілюстровані результати аналізу інвазії в матригелі in vitro клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій AN-019, при опроміненні й без нього.

Аналіз ангіогенезу

З експериментів з аналізом ангіогенезу було виявлено, що AN019 є найбільш ефективним у відношенні інгібування ангіогенезу.

Обробка темозоломідом викликала повне інгібування ангіогенезу в клітках ZR-71, у той час як у клітках MDA-MB-231 спостерігали тільки невелике інгібування в контрольних умовах зі зростанням інгібування після опромінення. Клітини ксенотрансплантату гліоми 4910 показали виражене інгібування ангіогенезу як при опроміненні, так і без нього. У випадку клітин 5310, інгібування ангіогенезу спостерігали в контрольних умовах, у той час як після обробки опроміненням відбувалася стимуляція ангіогенезу. Клітини гліоми U87 продемонстрували подібний характер інгібування, як при опроміненні, так і без нього.

Обробка AN024 викликала повне інгібування ангіогенезу в клітках ZR-71, у той час як у клітках MDA-MB-231 спостерігали тільки невелике інгібування в контрольних умовах і при обробці опроміненням. Клітини ксенотрансплантата гліоми 4910 продемонстрували значиме інгібування ангіогенезу як при опроміненні, так і без нього. У випадку клітин 5310, інгібування ангіогенезу спостерігали в контрольних умовах, у той час як ангіогенез далі інгібувався після обробки опроміненням. Клітини гліоми U87 продемонстрували значиме вповільнення ангіогенезу зі збільшенням інгібування після опромінення.

Обробка AN019 викликала повне інгібування ангіогенезу в клітках ZR-71, у той час як у клітках MDA-MB-231 спостерігали невелике інгібування, як у контрольних умовах, так і при обробці опроміненням. Клітини ксенотрансплантату гліоми 4910 продемонстрували інгібування

ангіогенезу, подібне із клітками MDA-MB-231, з підвищенням інгібування ангіогенезу після опромінення. У випадку клітин 5310, інгібування ангіогенезу було більшим у контрольних умовах, ніж після обробки опроміненням. Клітини гліоми U87 продемонстрували подібне вповільнення ангіогенезу, як при опроміненні, так і без нього.

5 На фіг.17 проілюстровані результати, отримані при аналізі ангіогенезу *in vitro* клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій AN-019, при опроміненні й без нього.

Вестерн-Блот аналіз

10 Вестерн-Блот аналіз клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій сполук даного винаходу показав, що клітини U87 не показують значимої зміни рівнів АКТ або PI3k, як при опроміненні, так і без нього, у той час як у клітках, оброблених AN024, спостерігали невелике зниження рівнів ERK, і після опромінення зниження підсилювалося. Клітини 4910 були подібні із клітками U87, зі зниженням рівнів АКТ після обробки AN024, і зниження рівнів АКТ підсилювалося після опромінення. У випадку клітин 15 5310, не спостерігали значимих відмінностей в експресії ERK, у той час як обробка AN019 викликала зниження рівнів експресії АКТ. У клітках, оброблених AN019 без опромінення, рівні Pbk практично не подавалися детекції, але повторно з'являлися після обробки опроміненням. У випадку клітин раку молочної залози MDA-MB-231, не спостерігали значимої зміни в АКТ, ERK або PI3k, у той час як у випадку ZR71 обробка AN019 викликала зниження рівнів АКТ, яке 20 підсилювалося після опромінення. Обробка AN024 не показала будь-якої значимої зміни в умовах без опромінення, у той час як після опромінення клітини, оброблені AN024, показали зниження експресії АКТ. Рівні PDK були відсутні при обробці AN019 як при опроміненні, так і без нього. Обробка AN024 приводила до зниження рівнів Pbk після опромінення. Рівні pAKT значно не змінювалися при кожній з обробок, з опроміненням або без нього, у той час як у клітках, 25 оброблених AN019, рівні pERK значно знижувалися, як при опроміненні, так і без нього. AN024 також показав зниження рівнів pERK, але меншою мірою ніж AN019. Обробка темозоломідом як при опроміненні, так і без нього, не показала яких-небудь значимих змін у рівнях pAKT або ERK.

На фіг.18 проілюстровані результати вестерн-блот аналізу клітин гліоми 4910, 5310 і U87 і клітин раку молочної залози MDAMB231 і ZR71 у присутності певних концентрацій AN-024, при 30 опроміненні й без нього.

Приклад 8 - Аналіз виживання при лейкозі (фіг.19-21)

Клітини K562, експресуючі люциферазу, імплантували внутрішньоочеревинно голим мишам; мишей сканували з використанням обладнання для візуалізації хепогену IVIS після внутрішньоочеревинних ін'єкцій люциферину для визначення імплантації. Обробку лікарським 35 засобом починали, як і в попередніх дослідженнях, через 15 діб після імплантації. Тварин обробляли до 42 діб, потім обробку лікарським засобом припиняли й визначали виживаність тварин відповідно до правил догляду за тваринами. Було виявлено, що в контрольних тварин розвивався лейкоз, і смерть відбувалася на 34 і 35 добу, згідно із правилами, автори даного винаходу прийняли рішення умертвити 8 тварин, що залишилися на 35 добу. Обробку 40 лікарським засобом припиняли на 42 добу після імплантації й визначали виживання тварин.

У тварин, оброблених AN024, спостерігалася смертність на 38 добу, у загинувих тварин при подальшій дослідженні не було виявлено збільшення селезінки й було визначено, що причина смерті відмінна від лейкозу, при цьому мазки крові від загинувих тварин взяти було не можна. Серед 10 використаних тварин в 8 тварин на 55 добу не було ознак лейкозу.

45 Серед тварин, оброблених AN019, не було ніякої смертності, і в 7 з 10 тварин спостерігалася повна відсутність симптомів лейкозу.

У тварин, оброблених іматинобом, спостерігалася повторне виникнення симптомів лейкозу після припинення введення, і в них смертність наступала на 55, 56, 57 і 58 добу. У тварин, що вижили, була виявлена наявність симптомів лейкозу.

50 На фіг.19 проілюстрована величина експресії люциферази на K5621uc, отримана в імплантованих мишей після обробки AN024, AN019 або іматинобом.

На фіг.20 проілюстрована кількість тварин, викуваних після обробки AN024 або AN019 на 58 добу. Обробку лікарським засобом припиняли на 42 добу, у тварин після обробки AN024 і AN019 спостерігалася продовження ефекту лікування після припинення обробки лікарським 55 засобом.

На фіг.21 проілюстрована кількість бластних клітин з мазків крові, узятих у тварин на зазначену добу. Обробку лікарським засобом припиняли на 42 добі. AN024 і AN019 продемонстрували ефективність після припинення обробки лікарським засобом. Було виявлено, що іматиноб є неефективним.

60 Приклад 8А - Дослідження ED₅₀, LD₅₀, MTD і терапевтичного індексу

У представлений нижче таблиці узагальнені ED₅₀, LD₅₀, цитована вище MTD (максимальна переносима доза) і терапевтичний індекс сполук даного винаходу в порівнянні з іматинобом. Використовували способи згідно J. Pharmacol. Exp. Ther., (1949), 96: 96-113.

Експериментальна речовина	LD ₅₀ (po) миші (мг/кг)	ED ₅₀ (po) миші (мг/кг)	MTD миші (мг/кг)	Терапевтичний* індекс LD ₅₀ / ED ₅₀
Іматинобу мезилат	949	12	250	78,9
AN-019	1133	11,5	500	98,5
AN-024	1440	10	500	144

* миші з лейкозом (K562)

5

Приклад 9 - Дослідження гліоми з опроміненням (фіг.22 і 23)

Голим мишам інтракраніально імплантували клітини ксенотрансплантату гліоми людини 4910 (1×10⁶ клітин). Через десять діб після імплантації мишам вводили AN019, AN024 або темозоломід з опроміненням або без нього (5 Gy/тиждень). Експеримент завершували на 40 добу після імплантації.

10

З результатів було виявлено, що в 100% контрольних тварин розвилися внутрічерепні пухлини й опромінення окремо мало дуже невеликий ефект на зниження розміру пухлини. У тварин, оброблених TMZ окремо, було виявлено зниження внутрічерепних пухлин, причому в 3 з 10 тварин спостерігалася повна відсутність пухлин. Обробка опроміненням, комбінована із введенням TMZ, викликала подальше зменшення розміру пухлин, причому у тварин меншою мірою спостерігалися симптоми внутрічерепного тиску (дугоподібна спина), у цьому випадку в 2 з 10 тварин спостерігалася відсутність видимих внутрічерепних пухлин.

15

У тварин, оброблених AN024 без опромінення, спостерігалася наявність внутрічерепних пухлин, однак пухлини були чітко обмеженими й не демонстрували дифузійних країв, як спостерігали в контролів або при введенні TMZ, 3 з 10 тварин виліковували. Після обробки опроміненням 7 з 10 тварин виліковували, тварини, у яких спостерігалася наявність пухлин, продемонстрували чітко обмежені прийнятні для хірургічної операції пухлини.

20

У тварин, оброблених AN019 окремо, спостерігалися пухлини, подібні з пухлинами тварин, оброблених AN024, і в цьому випадку, як при опроміненні, так і без нього, 6 з 10 тварин виліковували. Спостерігали, що після опромінення розмір пухлини значно зменшувався.

25

На фіг.22 проілюстровані результати, отримані в напівкількісному аналізі внутрічерепних пухлин у голих мишей після введення TMZ, AN024 або AN019 з опроміненням або без нього (5 Гр).

На фіг.23 показано графічне зображення голих мишей, що показали відсутність внутрічерепних пухлин після обробки лікарським засобом AN-019, AN-024 і без обробки опроміненням.

30

У наступних прикладах проілюстровані препаративний синтез і інші аспекти сполук даного винаходу

Приклад 10 - Одержання форми I

35

(3,5-біс-трифторметил)-N-[метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензамід формули I, одержували згідно четиристадійному способу прикладу 3 з WO2006/027795 (US 2007/0232633) у такий спосіб:

Одержання (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (I)

40

Стадія (I): Одержання нового (3,5-біс-трифторметил)-N-(4-метил-3-нітрофеніл)бензаміду

Спочатку одержували 3,5-біс-трифторметилбензоїлхлорид, який використовували в якості одної з вихідних речовин, у такий спосіб

До розчину 3,5-біс-трифторметилбензойної кислоти (Lancaster) (250,0 г, 0,97 моль) у хлороформі (2,5 л) додавали тіонілхлорид (576,0 г, 4,8 моль) протягом 15 хв при кімнатній температурі. Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 1 години.

45

До розчину 3,5-біс-трифторметилбензойної кислоти (Lancaster) (250,0 г, 0,97 моль) у хлороформі (2,5 л) додавали тіонілхлорид (576,0 г, 4,8 моль) протягом 15 хв при кімнатній температурі. Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 1 години. Надлишок тіонілхлориду видаляли спільною дистиляцією із хлороформом при зниженому тиску.

50

Після завершення дистиляції, отриманий 3,5-біс-трифторметилбензоїлхлорид охолоджували до кімнатної температури й розчиняли в 400 мл хлороформу. Розчин 4-метил-3-нітроаніліну (92,0 г, 0,60 моль) у хлороформі (1,2 л) охолоджували до -5°C і додавали триетиламін (304,8 г, 3,0 моль). По краплях додавали розчин 3,5-біс-трифторметилбензоїлхлориду в хлороформі при -

5°C протягом 60-75 хв. Отриману суспензію перемішували протягом 1 год при -5°C. Суспензію піддавали дистиляції до кінцевого об'єму 800 мл і фільтрували, промивали охолодженим хлороформом (200 мл) і сушили у вакуумі, з одержанням 160,0 г нового (3,5-біс-трифторметил)-N-(4-метил-3-нітрофеніл)бензаміду (68%) у вигляді кремових кристалів (чистота по ВЕЖХ 98,2%) MR-123-130°C.

Стадія (II): одержання (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-аміно-4-метилфеніл)бензаміду

Суспензію нового (3,5-біс-трифторметил)-N-(4-метил-3-нітрофеніл)бензаміду (160 г, 0,41 моль) і хлориду олова (II) (460,8 г, 2,0 моль) в абсолютному етанолі (850 мл) кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 40 хв. Потім отриману суспензію охолоджували до кімнатної температури й гасили 5 л крижаної води. рН реакційної суміші доводили до 8,0 за допомогою 4,3 л 5% розчину гідроксиду натрію й екстрагували 2×2 л етилацетатом. Шар етилацетату промивали послідовно водою й насиченим розчином солі й сушили над сульфатом натрію. Етилацетат повністю відганяли, до осаду додавали 500 мл гексану й фільтрували. Осад на фільтрі сушили при високому вакуумі при 60°C, з одержанням 96,0 г нового (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-аміно-4-метилфеніл)бензаміду (65%) у вигляді жовтих кристалів. (Чистота по ВЕЖХ 98,5%) MR-153-156°C.

Стадія (III): одержання (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-аміно-4-метилфеніл)бензаміду

Суспензію (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-аміно-4-метилфеніл)бензаміду (90 г, 0,20 моль) у н-бутанолі (500 мл) обробляли послідовно концентрованою азотною кислотою, доти, поки значення рН не досягало 2,5 (15,9 г), і розчином ціанаміду (15,7 г, 0,37 моль) у воді (15 мл) протягом 30 хв. Отриману реакційну суміш перемішували при кип'ятінні зі зворотним холодильником протягом 6 год. Потім реакційну суміш повністю відганяли у вакуумі й осаду давали можливість охолотитися до кімнатної температури. До реакційної маси додавали суміш 180 мл метанолу й 180 мл ІРЕ і її перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год. Продукт фільтрували при відсмоктуванні, промивали сумішшю метанолу й ІРЕ (3×50 мл) і сушили у вакуумі при 60°C, з одержанням 72 г нітратної солі нового (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-гуанідино-4-метилфеніл)бензаміду з виходом 62% від теоретичного (чистота по ВЕЖХ 99,2%), MR-285-287°C.

Стадія (IV): одержання (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (I)

Суспензію нітрату (3,5-біс-трифторметил)-N-(3-гуанідино-4-метилфеніл)бензаміду (70 г, 0,15 моль) у н-бутанолі (470 мл) в атмосфері азоту обробляли послідовно пластівцями гідроксиду натрію (7,0 г, 0,18 моль) і 3-диметиламіно-1-піридин-3-ілпропеноном (28,0 г, 0,16 моль). Отриману суспензію кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2 год. Реакційні суміші перетворювалися в гомогенний темно-жовтогогарячий розчин і диметиламін видаляли відгоном з н-бутанолом. Реакційну масу охолоджували до кт, додавали суміш води й хлороформу (300 мл+300 мл) і шар хлороформу відокремлювали. Шар хлороформу промивали водою й піддавали дистиляції до кінцевого об'єму 70 мл. До реакційної маси додавали етилацетат (350 мл) і фільтрували при відсмоктуванні, виділену тверду речовину промивали етилацетатом (2×50 мл) і водою (2×50 мл) і сушили у вакуумі при 60°C.

Вихід: 48,0 г (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-іламінопіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду формули I.

Сполуку формули I, отриману чотирістадійним способом, суспендували в 480 мл хлороформу й нагрівали до 50-55°C. Реакційну масу охолоджували до кімнатної температури, і потім охолоджували до (-5)-0°C. Продукт фільтрували й промивали хлороформом (250 мл). Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C. Вихід склав 40 г. Температура плавлення 230-237°C (DSC).

На фіг.1, доданої до даного опису, представлена порошкова рентгенограма (XRPD), на якій показаний, головним чином, по суті чистий зразок форми I, отриманої згідно зі способом, описаним у даному прикладі. Значення 2θ і інтенсивності наведено в таблиці 1.

На фіг.4 представлена термограма DSC кристалічної модифікації I, отриманої способом, описаним у даному прикладі (в інтервалі від 40,0 до 325°C, 10,00°C/хв; N₂ 80 мл/хв).

На фіг.7 показані кристали кристалічної форми I сполуки формули (I)

Приклад 11 - Одержання форми II

(3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензамід формули I, одержували згідно способу прикладу 4 описаного у WO2006/027795 (US 2007/0232633) у такий спосіб:

Альтернативний спосіб одержання (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду

Спочатку одержували 3,5-біс-трифторметилбензоїлхлорид, який використовували в якості

одної з вихідних речовин, у такий спосіб:

Тіонілхлорид (2,04 кг, 17,2 моль) додавали протягом 15 хв до розчину 3,5-біс-трифторметилбензойної кислоти (855,0 г, 3,3 моль) і ДМФА (9 мл) у хлороформі (9 л) при кімнатній температурі. Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 1 години. Надлишок тіонілхлориду видаляли спільною дистиляцією із хлороформом при зниженому тиску при 40°C. Після закінчення дистиляції, отриманий 3,5-біс-трифторметилбензоїлхлорид охолоджували до кімнатної температури й розчиняли в 700 мл хлороформу.

Розчин N-(5-аміно-2-метилфеніл)-(3-піридил)-2-піримідинаміну (0,73 кг, 2,64 моль) у хлороформі (9 л) охолоджували до -5°C и додавали триетиламін (1,03 кг, 10,2 моль). По краплях додавали 3,5-біс-трифторметилбензоїлхлорид у хлороформі при -5°C протягом 60-75 хв. Отриману суспензію перемішували протягом 1 год при -5°C. Суспензію фільтрували, промивали D.M. водою й метанолом, з одержанням 1,3 кг неочищеної вологої зазначеної в заголовку сполуки, яка при перекристалізації з метанолу давала 0,82 кг (60%) (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (I).

Сполуку формули-I, отриману зазначеним вище способом, суспендували в 5 л метанолу й кип'ятили зі зворотним холодильником. Реакційну масу витримували при тій же температурі протягом 30-40 хвилин, повільно охолоджували до 40-45°C та витримували при цій температурі протягом 60 хвилин. Продукт фільтрували й промивали 0,5 л метанолу при 40-45°C. Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C. Вихід: 650 г.

На фіг.2, доданої до даного опису, представлена порошкова рентгенограма (XRPD), на якій показаний, головним чином, по суті чистий зразок форми II, отриманої способом, описаним у даному прикладі. Значення 2θ і інтенсивності наведено в таблиці 2.

На Фіг.5 представлена термограма DSC кристалічної форми II, отриманої способом, описаним у даному прикладі (інтервал від 30,0 до 350°C, 10,00°C/хв; N₂ 80 мл/хв).

На Фіг.8 показані кристали кристалічної форми II сполуки формули (I)

Приклад 12 - Одержання форми III

(3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензамід формули I, одержували способом прикладу 4 в WO2006/027795, як зазначено в представленому вище прикладі 11.

Сполуку формули I, отриману зазначеним вище способом, суспендували в суміші 2,5 л диметилформаміду й 4,1 л ацетону й нагрівали до 50°C. Реакційну масу витримували при тій же температурі протягом 30-40 хвилин, потім повільно охолоджували до 25-30°C и витримували при цій температурі протягом 60 хвилин. Суспензію продукту потім охолоджували до -5°C, фільтрували й промивали 0,8 л ацетону. Вологий осад суспендували в 0,4 л ацетону й кип'ятили зі зворотним холодильником. Охолоджену суспензію фільтрували й промивали 0,4 л ацетону. Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C. Вихід: 500 г.

На фіг.3, доданої до даного опису, представлена порошкова рентгенограма (XRPD), на якій показаний, головним чином, по суті чистий зразок форми III, отриманої способом, описаним у даному прикладі. Значення 2θ і інтенсивності наведено в таблиці 3.

На фіг.6 представлена термограма DSC кристалічної модифікації форми III, отриманої способом, описаним у даному прикладі (в інтервалі від 40,0 до 325°C, 10,00°C/хв; N₂ 80 мл/хв).

На фіг.9 показані кристали кристалічної форми III сполуки формули (I).

Приклад 13 - Одержання форми III

(3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензамід формули I, одержували згідно зі способом прикладу 4 в WO2006/027795, як зазначено в представленому вище прикладі 11.

Сполуку формули I, отриману зазначеним вище способом, суспендували в суміші 2,5 л диметилформаміду й 4,1 л гексану й нагрівали до 50°C. Реакційну масу витримували при тій же температурі протягом 30-40 хвилин, повільно охолоджували до 25-30°C та витримували при цій температурі протягом 12 годин. Суспензію продукту потім охолоджували до -5°C, фільтрували й промивали 0,8 л гексану. Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C. Вихід: 400 г; DSC: 248,2 (пік).

Приклад 14 - Одержання форми III

(3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензамід формули I, одержували згідно зі способом прикладу 4 в WO2006/027795, як зазначено в представленому вище прикладі 11.

Сполуку формули I, отриману зазначеним вище способом, суспендували в суміші 2,5 л диметилформаміду й 4,1 л толуолу й нагрівали до 50°C. Реакційну масу витримували при тій же температурі протягом 30-40 хвилин, повільно охолоджували до 25-30°C и витримували при цій

температурі протягом 12 годин. Суспензію далі охолоджували до -5°C , фільтрували й промивали 0,8 л толуолу. Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C . Вихід: 450 г; DSC: 246,7 (пік).

Приклад 15 - Одержання форми III

5 (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензамід формули I, одержували згідно зі способом прикладу 4 в WO2006/027795, як зазначено в представленому вище прикладі 11.

10 Сполуку формули I, отриману зазначеним вище способом, суспендували в суміші 2,5 л оцтової кислоти й нагрівали до 50°C . Реакційну масу витримували при тій же температурі протягом 30-40 хвилин, повільно охолоджували до $25-30^{\circ}\text{C}$ та витримували при цій температурі протягом 96 годин. Продукт фільтрували й промивали 0,4 л охолодженої оцтової кислоти. Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C . Вихід: 650 г; DSC: 246,3 (пік).

Приклад 16 - Одержання форми III

15 Форму I, отриману за прикладом 10 (40 г), суспендували в суміші 120 мл диметилформаміду й 200 мл ацетону й нагрівали до 50°C . Реакційну масу витримували при тій же температурі протягом 30-40 хвилин, повільно охолоджували до $25-30^{\circ}\text{C}$ и витримували при цій температурі протягом 60 хвилин. Суспензію охолоджували до -5°C , фільтрували й промивали 40 мл ацетону. Вологий осад суспендували в 200 мл ацетону, нагрівали до температури кипіння зі зворотним холодильником і витримували протягом 60 хвилин при температурі кип'ятіння зі зворотним холодильником. Суспензію охолоджували до 25°C , фільтрували й промивали 40 мл ацетону. Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C . Вихід: 25 г; DSC: $247,0^{\circ}\text{C}$ (пік).

Приклад 17 - Одержання форми III

25 Форму II, отриману за прикладом 11 (650 г), суспендували в суміші 1,95 л диметилформаміду й 3,25 л ацетону й нагрівали до 50°C . Реакційну масу витримували при тій же температурі протягом 30-40 хвилин. Реакційну масу повільно охолоджували до $25-30^{\circ}\text{C}$ и витримували при цій температурі протягом 60 хвилин. Продукт фільтрували й промивали 0,7 л ацетону. Вологий осад суспендували в 3,5 л ацетону й нагрівали до температури кип'ятіння зі зворотним холодильником. Суспензію охолоджували до 25°C , фільтрували й промивали 0,7 л ацетону. Вологий осад сушили протягом 6 годин при 60°C . Вихід: 395 г; DSC: $246,5^{\circ}\text{C}$ (пік).

30 Як використано в даному описі, термін "приблизно" відноситься до відхилення в кількості або діапазоні, яке є загальноприйнятим в області органічної хімії, наприклад, до конкретного відхилення в температурах або часі при вимірі в реальних ситуаціях у лабораторії органічної хімії, при збільшенні масштабу або у виробничому приміщенні, або в оцінці антипроліферативних засобів. Будь-який діапазон або кількість, використовувана в описі даного винаходу, які модифіковані терміном "приблизно", також є частиною винаходу, навіть якщо вони не доповнені терміном "приблизно". Наприклад, вказівка на "приблизно від 10 до приблизно 20" також включає вказівку на "від 10 до 20".

40 Слід зазначити, як використано в даному описі й прикладеній формулі винаходу, що форма однини включає множину, якщо зміст явно не вказує на інше. Таким чином, наприклад, вказівка на композицію, що містить "сполуку", включає суміш двох або більш сполук. Також слід зазначити, що термін "або" звичайно використовують у його значенні "і/або", якщо зміст явно не вказує на інше.

Усі публікації й патентні заявки в даному описі відповідають рівню середнього фахівця в галузі, до якої відноситься даний винахід.

45 Винахід описаний за допомогою різних і кращих варіантів здійснення й способів. Однак слід розуміти, що можуть бути проведені зміни й модифікації, зберігаючи сутність і об'єм винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

50 1. Кристалічна форма III (3,5-біс-трифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формули I), яка має характеристики XRPD:

Кут [2-тета]	Значення d Ангстрем	Інтенсивність, %
5,909	14,94417	24,9
6,491	13,60517	66,4
8,267	10,68690	100,0
11,854	7,45967	58,2
13,181	6,71147	40,0
14,609	6,05866	50,0
15,960	5,54851	5,8

16,612	5,33224	9,5
18,826	4,70995	14,4
19,571	4,53226	52,1
21,302	4,16774	54,0
21,612	4,10861	37,7
22,160	4,00828	3,5
22,970	3,86869	23,8
23,278	3,81812	51,6
24,000	3,70491	8,7
25,112	3,54329	11,1
25,887	3,43895	3,1
26,500	3,36079	3,3
27,517	3,23887	3,4
29,476	3,02788	6,8
29,857	2,99011	8,6
30,474	2,93102	3,5
32,886	2,72133	3,2
33,559	2,66829	5,0
35,916	2,49836	3,8
39,645	2,27157	4,9
43,061	2,09893	2,6
43,748	2,06753	3,8
44,055	2,05383	3,9

2. Кристалічна форма III за п. 1, яка має температуру плавлення 240 °C або вище.

3. Кристалічна форма III за п. 1, яка є по суті чистою.

- 5 4. Спосіб одержання кристалічної форми III (3,5-бістрифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), як визначено в п. 1, в якому здійснюють обробку сполуки формули I у кристалічній формі I або II оцтовою кислотою або сумішшю диметилформаміду й ацетону, гексану або толуолу; і наступну обробку однократно обробленої сполуки оцтовою кислотою, ацетоном, гексаном або толуолом;
- 10 де кристалічна форма I має характеристики XRPD:

Кут [2-тета]	Значення d Ангстрем	Інтенсивність, %
6,793	13,00131	13,9
9,823	8,99680	3,9
11,106	7,96069	54,2
13,267	6,66829	48,5
16,386	5,40523	7,0
17,941	4,94015	11,3
18,997	4,66785	13,0
19,778	4,48530	50,5
21,894	4,05635	100,0
22,396	3,96650	20,5
23,469	3,78750	19,7
24,466	3,63545	32,4
24,939	3,56759	52,6
25,525	3,48695	14,6
26,968	3,30351	10,3
28,777	3,09991	22,0
30,545	2,92436	14,8
33,011	2,71129	11,0

і кристалічна форма II має характеристики XRPD:

Кут [2-тета]	Значення d Ангстрем	Інтенсивність, %
6,500	13,58651	12,2

10,816	8,17295	100,0
12,094	7,31197	3,4
12,988	6,81061	49,7
16,120	5,49381	6,0
17,669	5,01562	10,9
19,521	4,54367	41,7
21,675	4,09687	39,9
22,083	4,02198	17,1
23,230	3,82602	21,9
24,264	3,66523	17,8
24,639	3,61023	8,5
28,460	3,13371	4,8
29,328	3,04290	2,3
30,256	2,95165	4,1
32,746	2,73261	3,5
34,035	2,63201	3,1
35,590	2,52050	1,5
39,660	2,27072	1,9
42,123	2,14346	2,5
44,193	2,04777	1,7

5. Спосіб за п. 4, в якому здійснюють:

обробку сполуки формули I у кристалічній формі I або II оцтовою кислотою; і наступну обробку однократно обробленої сполуки оцтовою кислотою.

6. Спосіб за п. 4, в якому здійснюють:

обробку сполуки формули I у кристалічній формі I або II сумішшю диметилформаміду й ацетону; і

наступну обробку однократно обробленої сполуки ацетоном.

7. Спосіб за п. 4, в якому здійснюють:

обробку сполуки формули I у кристалічній формі I або II сумішшю диметилформаміду й гексану; і

наступну обробку однократно обробленої сполуки гексаном.

8. Спосіб за п. 4, в якому здійснюють:

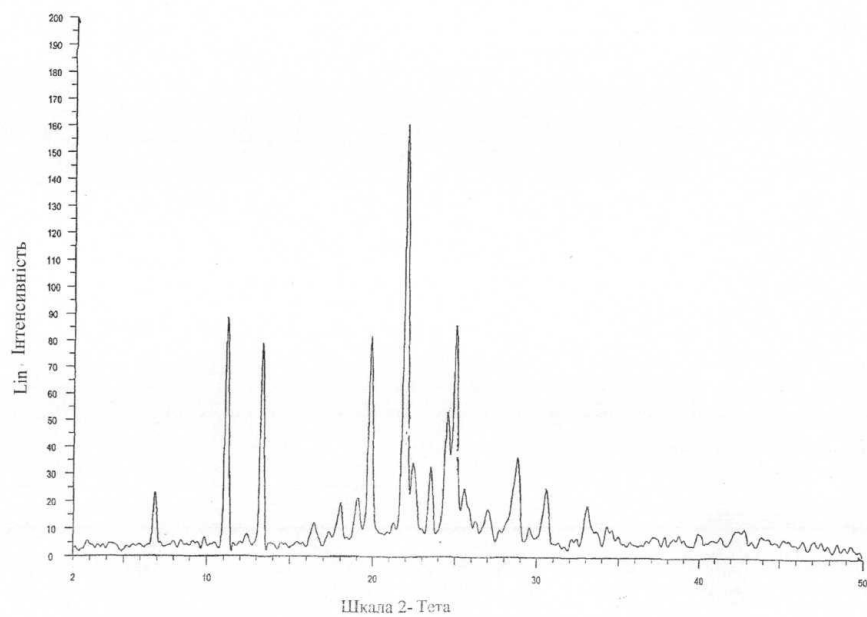
обробку сполуки формули I у кристалічній формі I або II сумішшю диметилформаміду й толуолу; і

наступну обробку однократно обробленої сполуки толуолом.

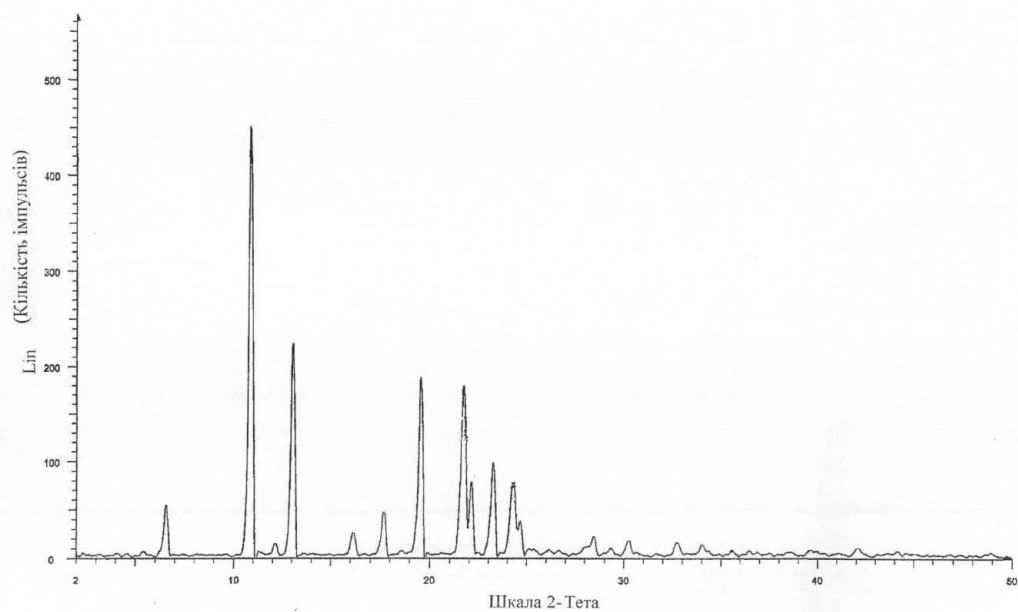
9. Кристалічна форма III (3,5-бістрифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), як визначено в п. 1, для використання у способі лікування проліферативного захворювання.

10. Фармацевтична композиція, що містить фармацевтично прийнятний ексципієнт і кристалічну форму III (3,5-бістрифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), де кристалічна форма III, як визначено в п. 1.

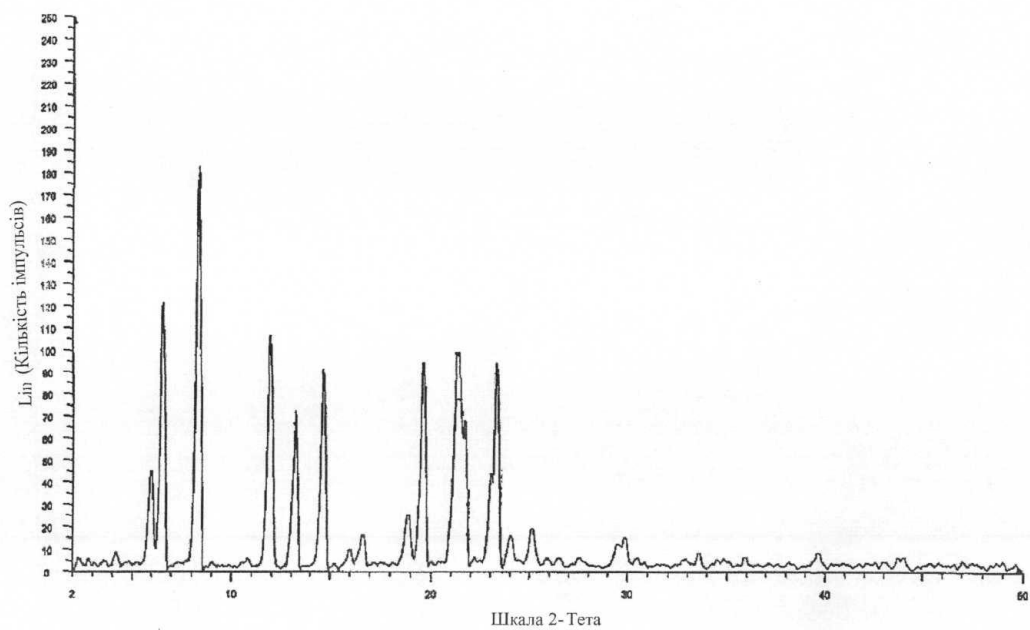
11. Застосування кристалічної форми III (3,5-бістрифторметил)-N-[4-метил-3-(4-піридин-3-ілпіримідин-2-іламіно)феніл]бензаміду (формула I), як вказано в п. 1, для виготовлення антипроліферативного лікарського засобу для лікування пухлинного захворювання.



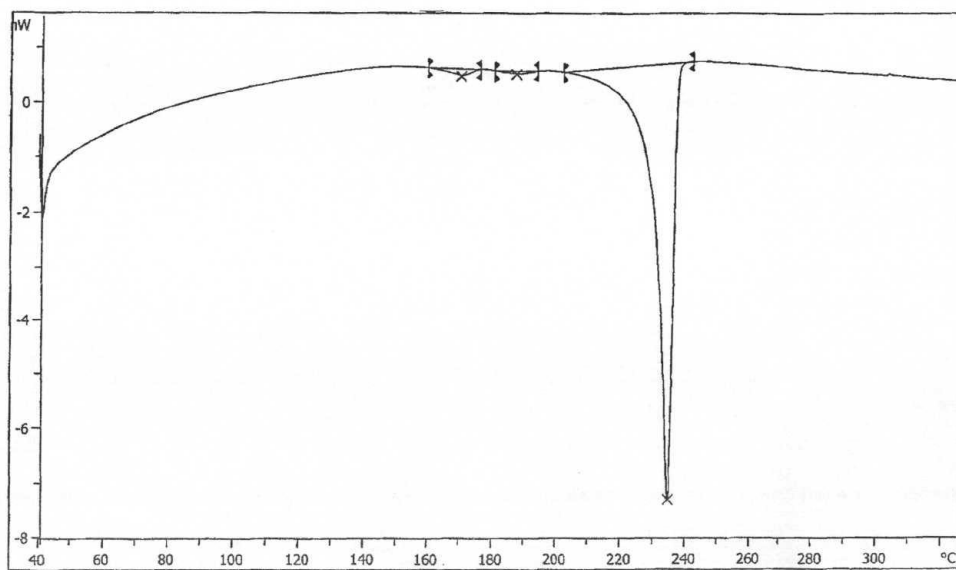
Фіг. 1



Фіг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

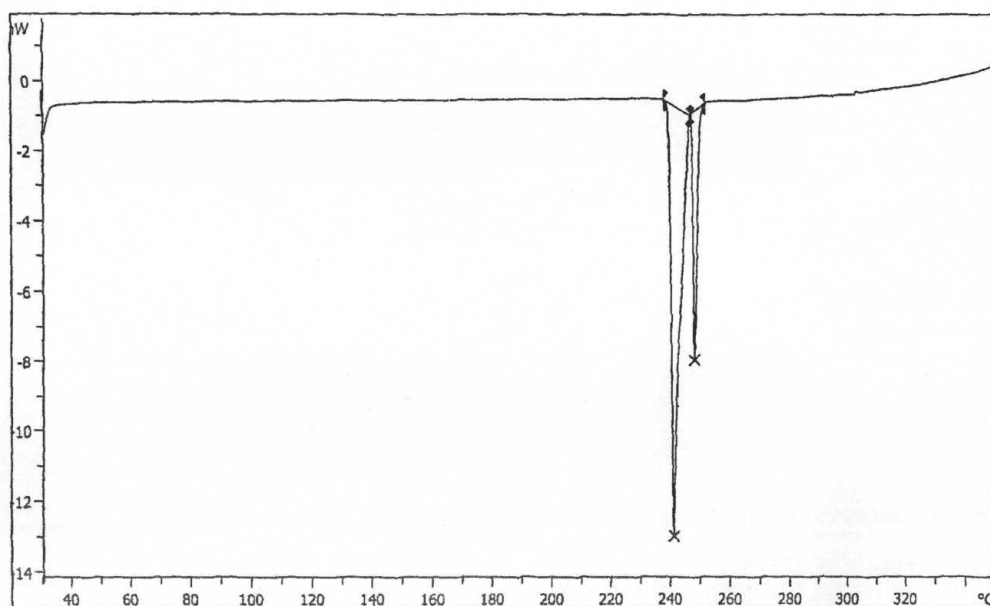


Fig. 5

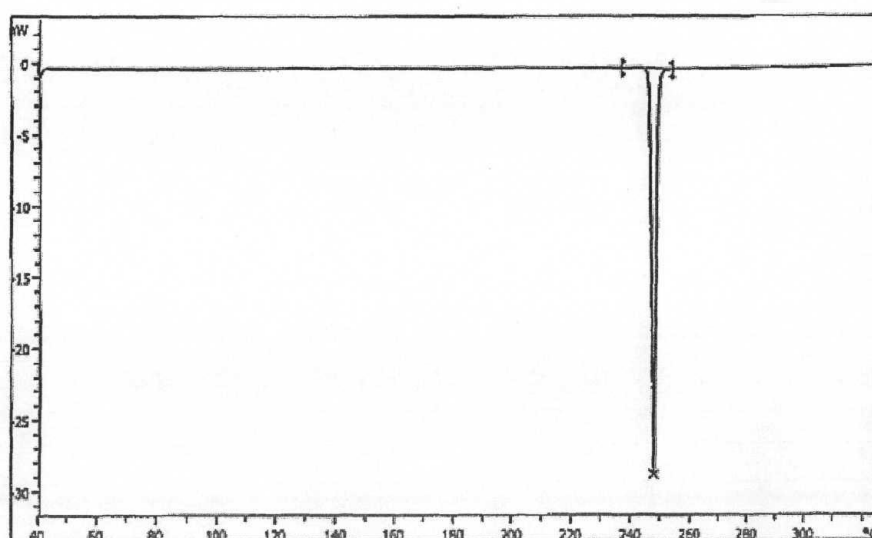


Fig. 6

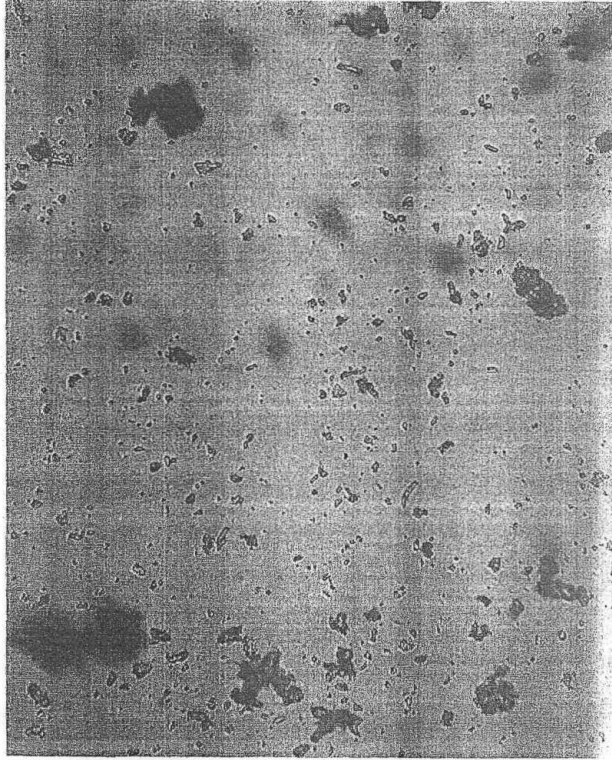


Fig. 7

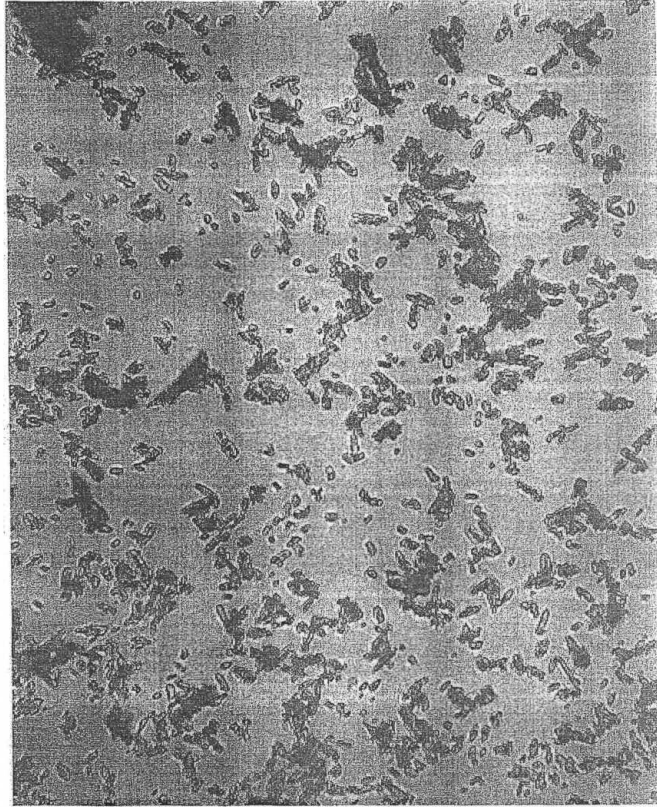
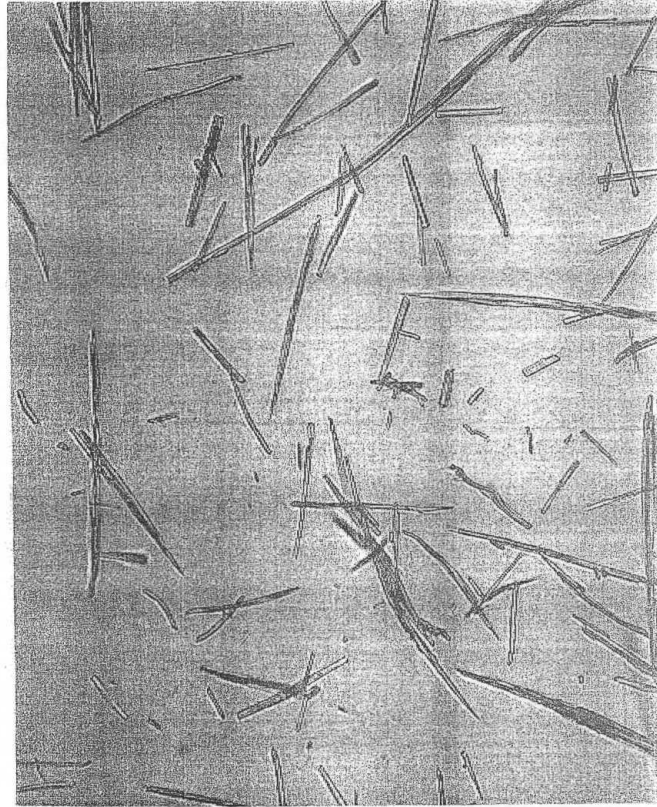
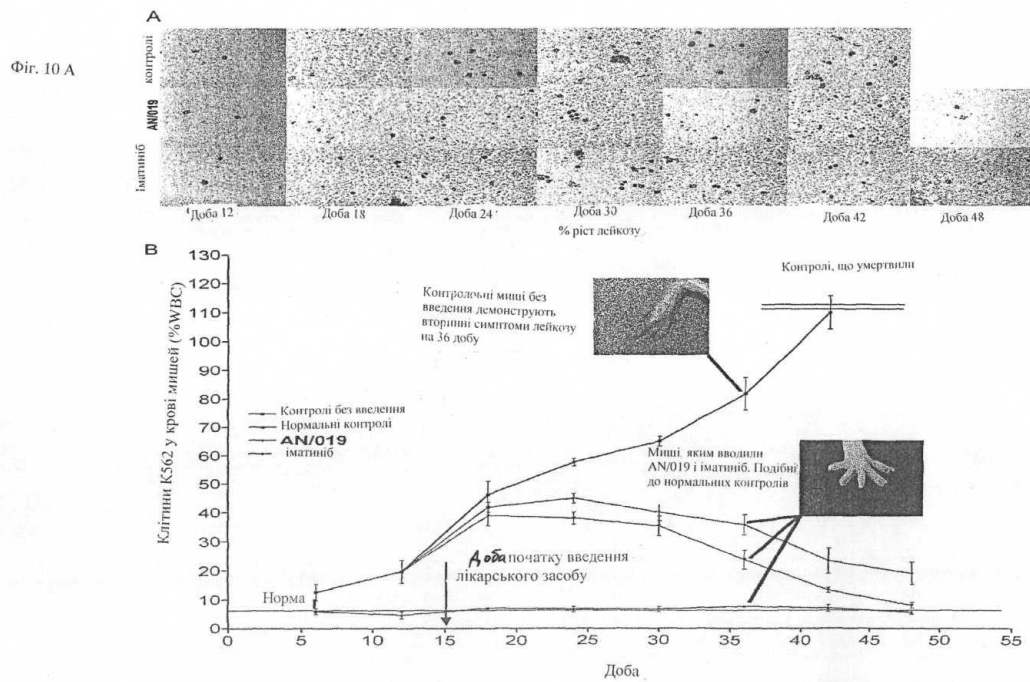


Fig. 8



Фіг. 9



Фіг. 10 В

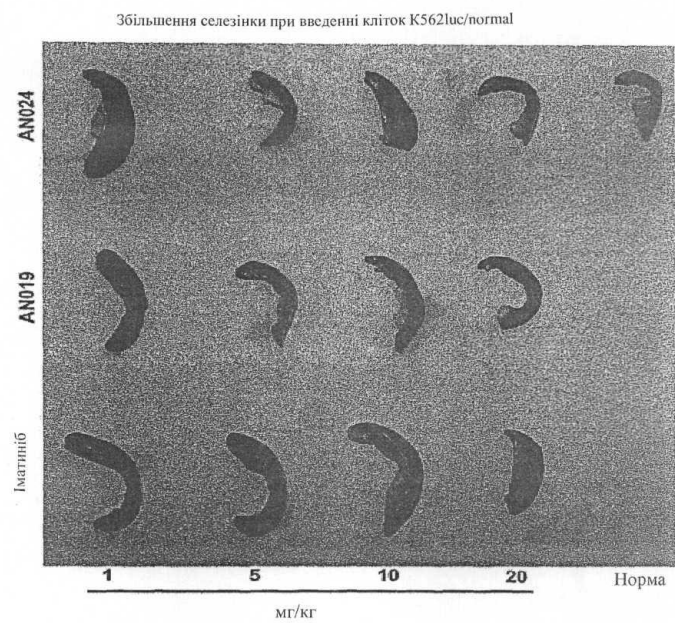


Fig. 11

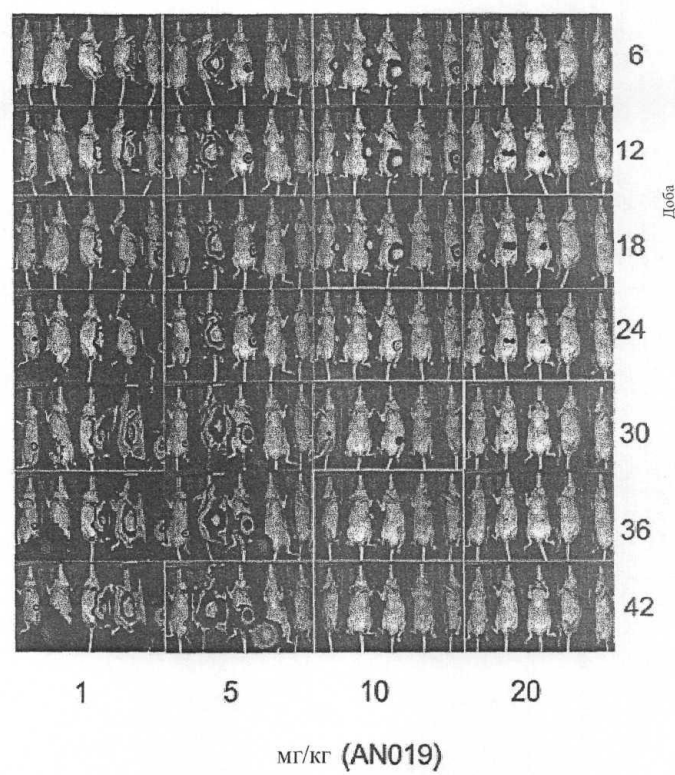
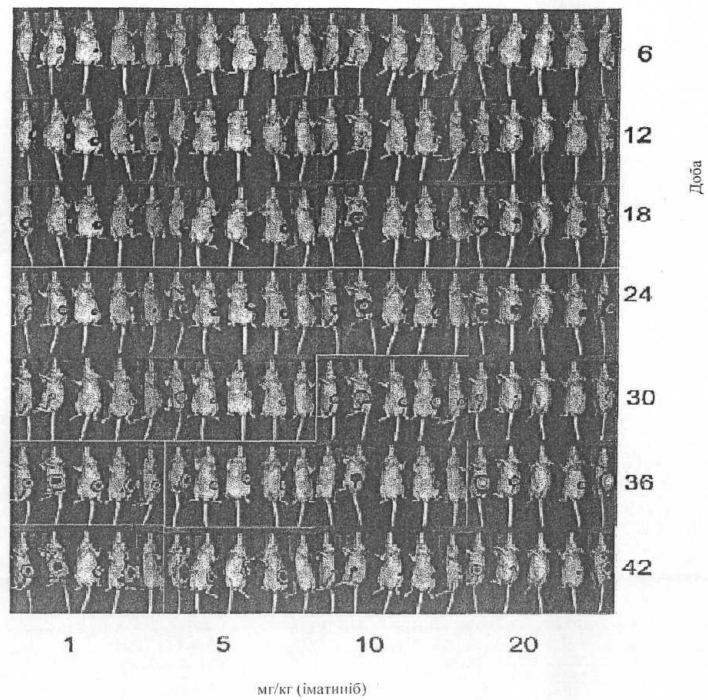
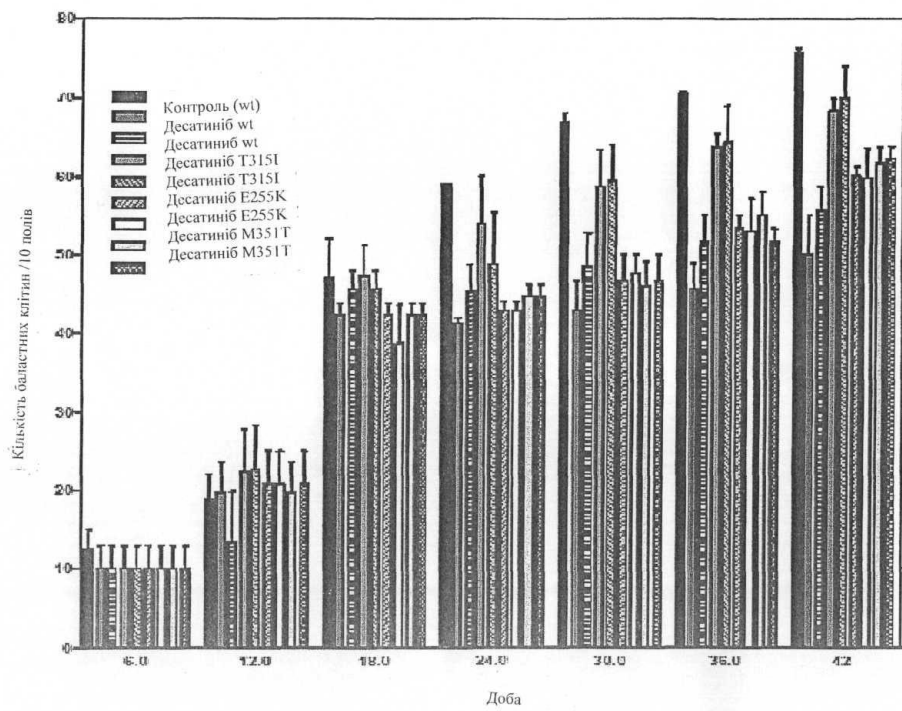


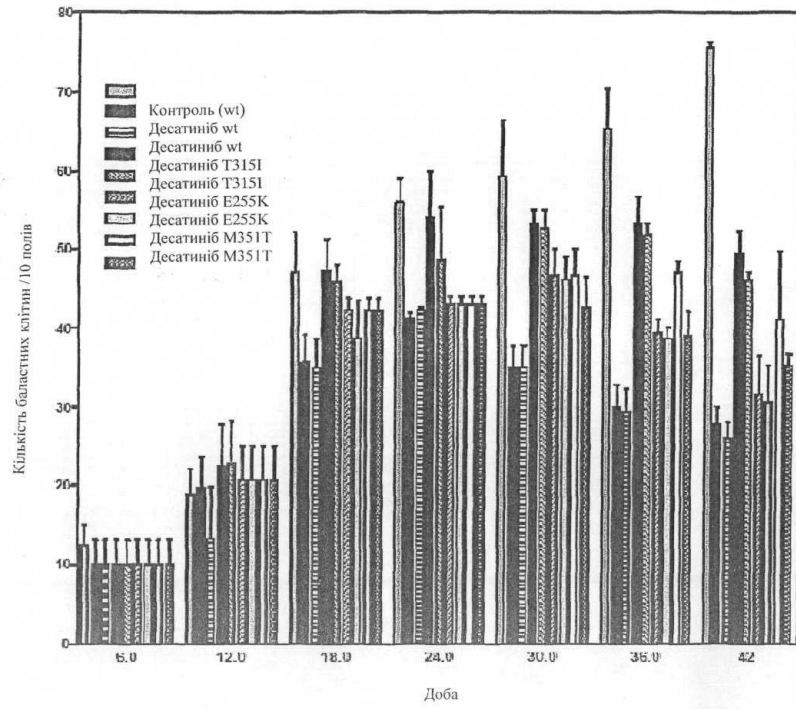
Fig. 12



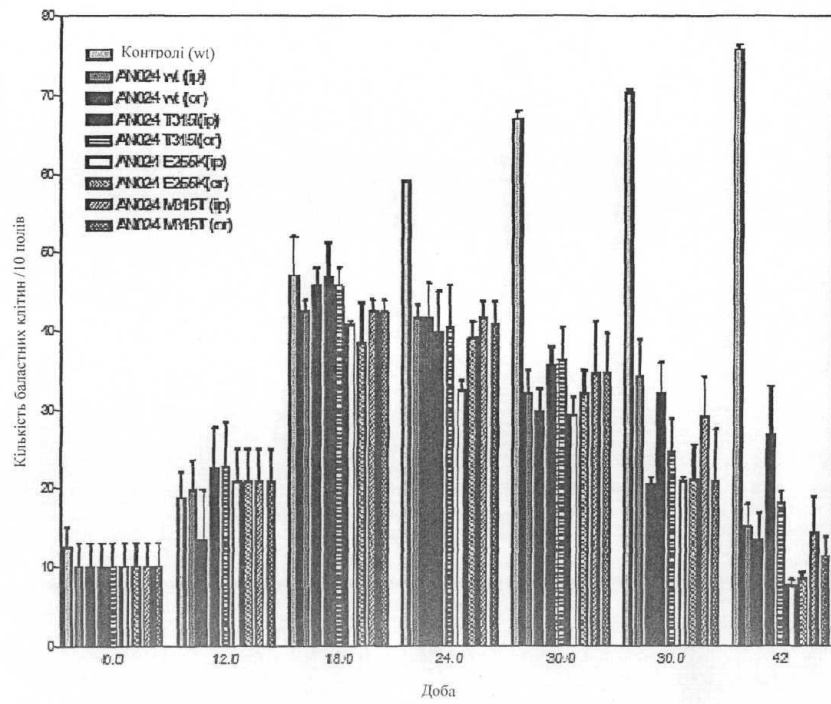
Фіг. 13



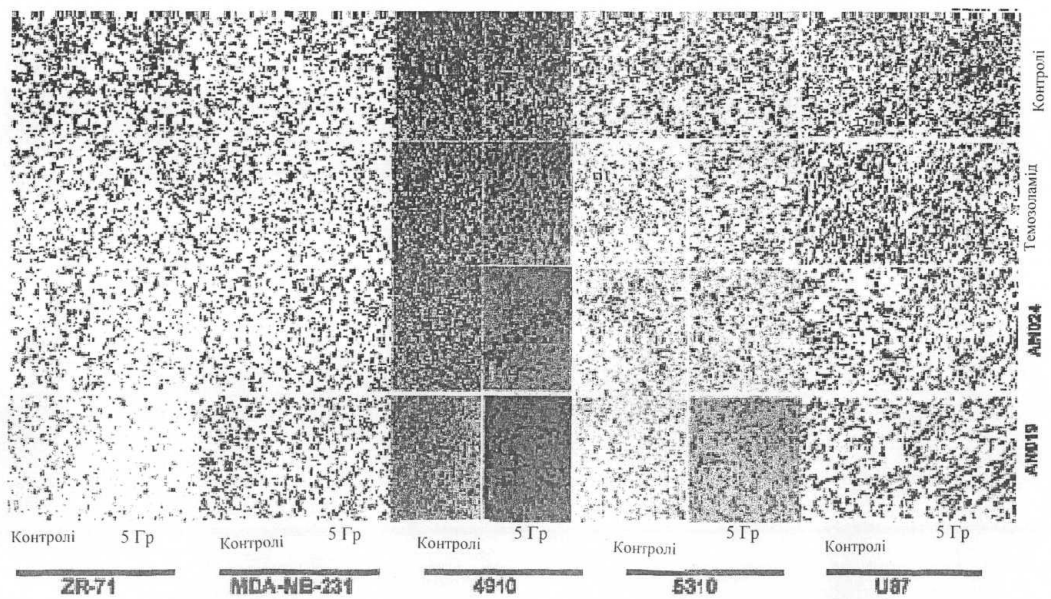
Фіг. 14А



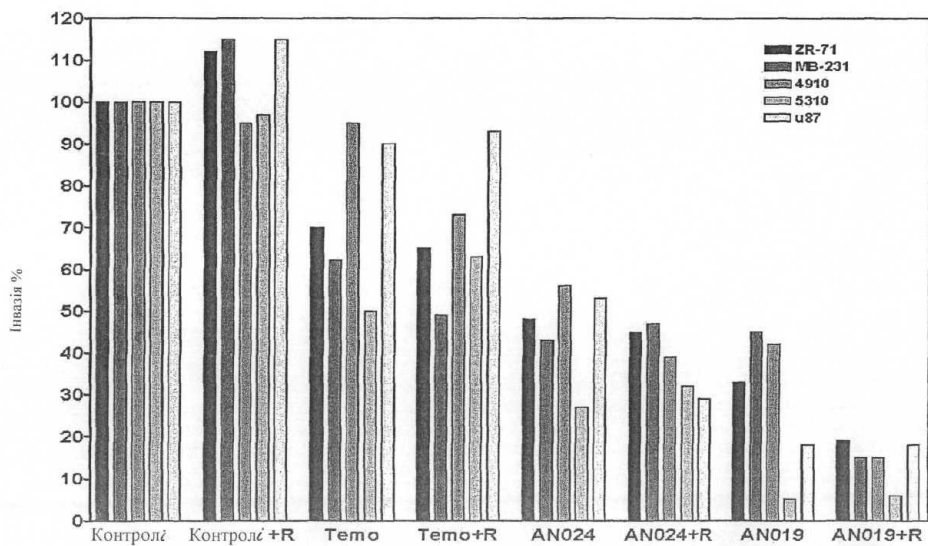
Фіг. 14В



Фіг. 14С



Фіг. 15



Фіг. 16

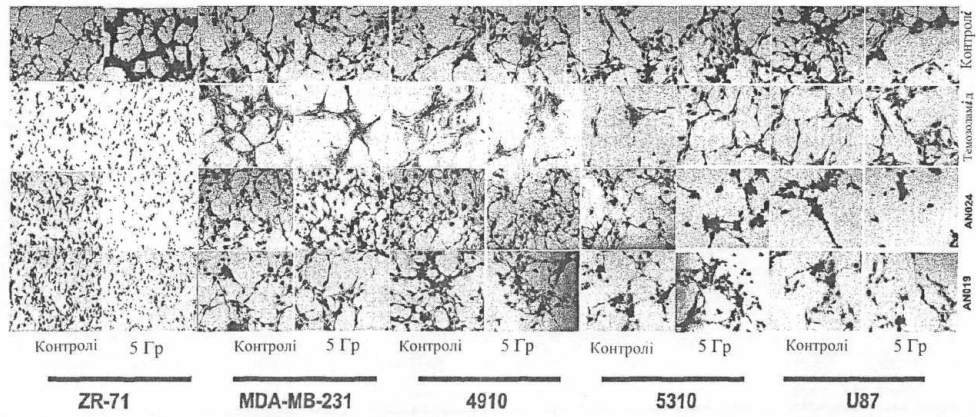


Fig. 17

Вестерн-блот-аналіз

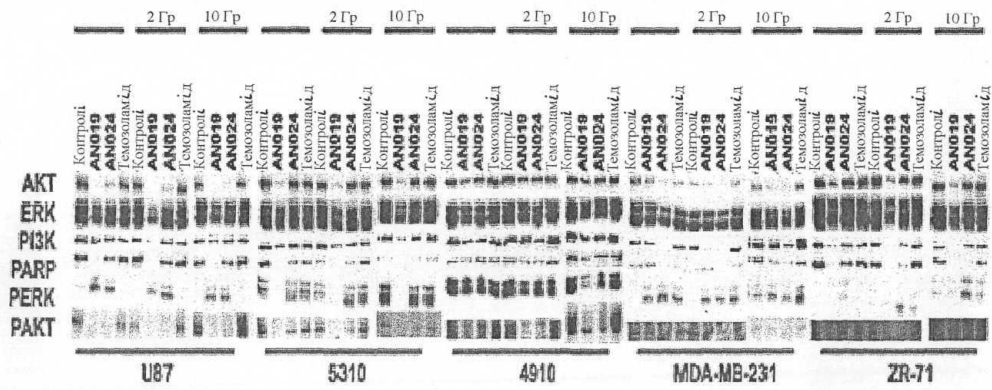
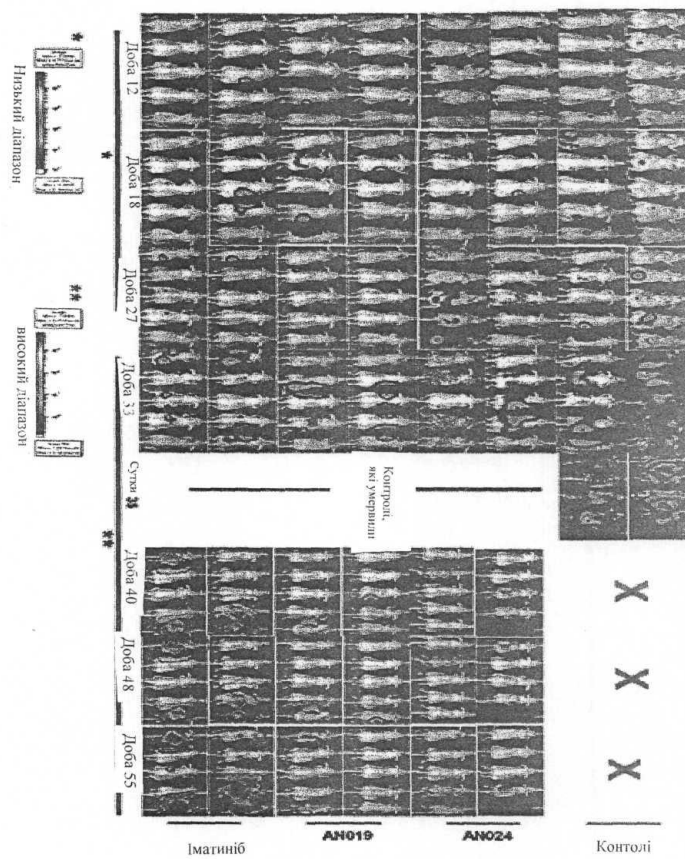
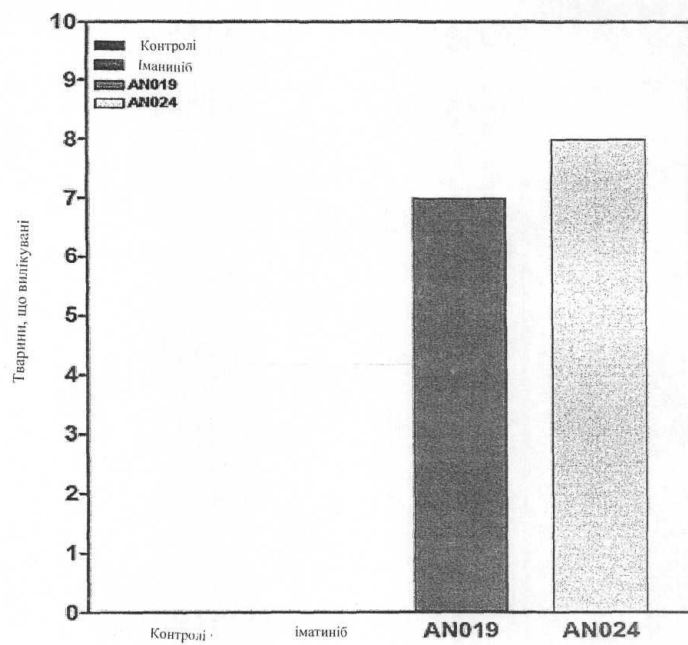


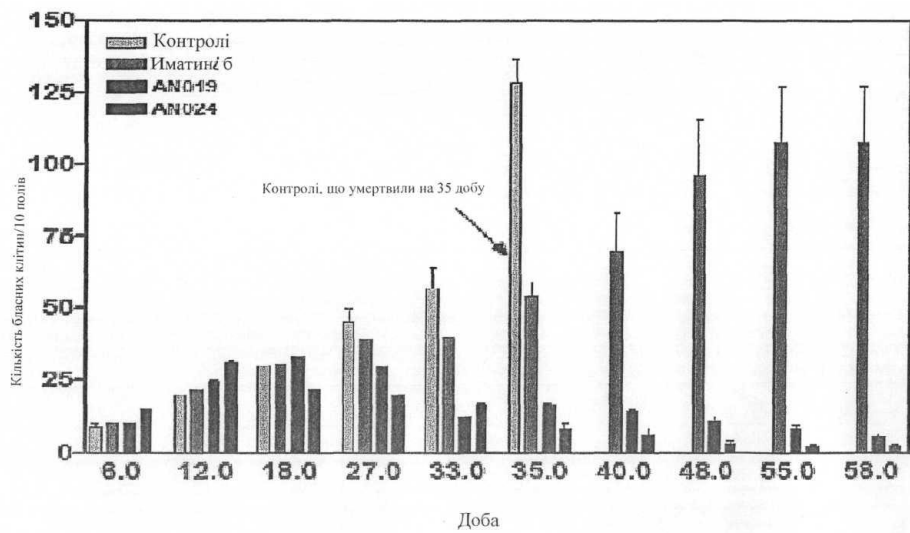
Fig. 18



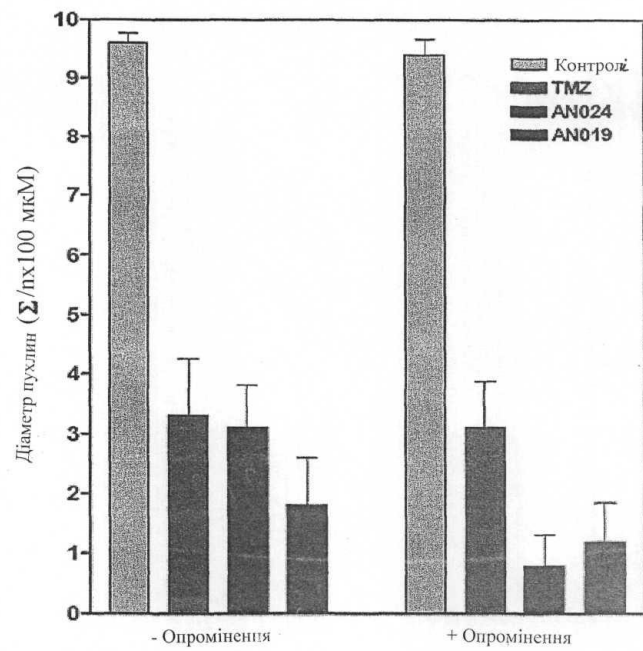
Фіг. 19



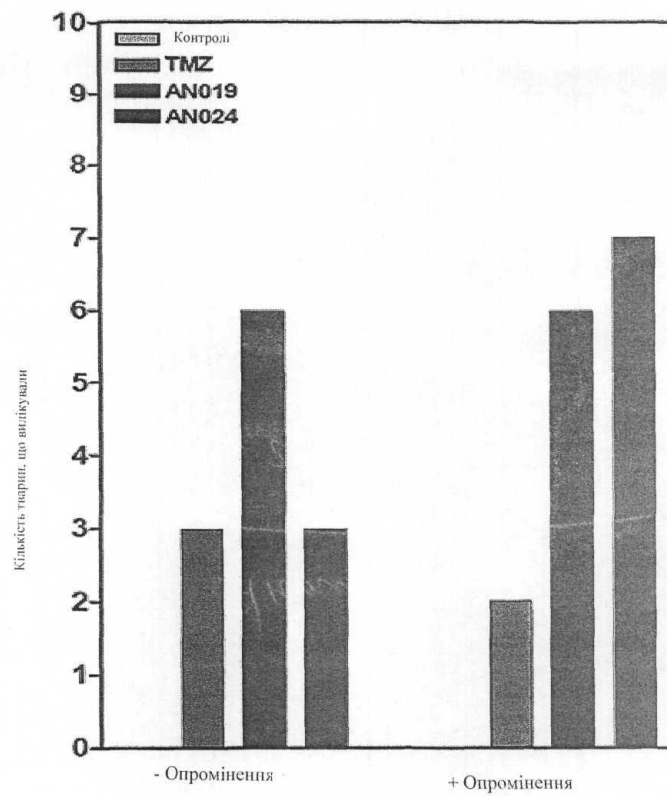
Фіг. 20



Фіг. 21



Фіг. 22



Фіг. 23

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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