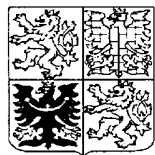


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286 654

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998 - 750
(22) Přihlášeno: 09.09.1996
(30) Právo přednosti:
13.09.1995 IT 1995/MI1904
(40) Zveřejněno: 15.07.1998
(Věstník č. 7/1998)
(47) Uděleno: 30.03.2000
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.05.2000
(Věstník č. 5/2000)
(86) PCT číslo: PCT/EP96/03935
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 97/10245

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:
C 07 D 471/06
A 61 K 31/415
A 61 P 35/04

/(C 07 D 471/06, C 07 D 231:00,
C 07 D 221:00)

(73) Majitel patentu:

THE UNIVERSITY OF
VERMONT AND STATE
AGRICULTURAL COLLEGE,
Burlington, VT, US;
NOVUSPHARMA S.P.A.,
Milano, IT;

(72) Původce vynálezu:

Menta Ernesto, Monza, IT;
Oliva Ambrogio, Monza, IT;
Spinelli Silvano, Monza, IT;
Krapcho Paul, Monza, IT;

(74) Zástupce:

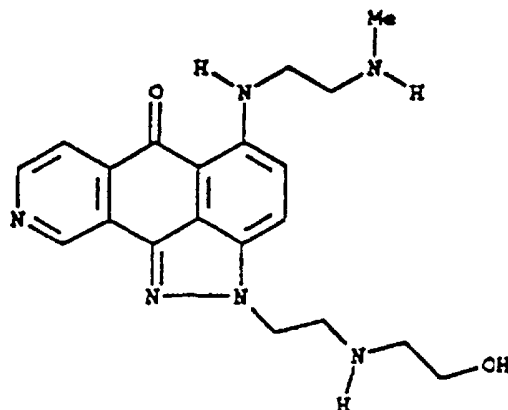
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
110 00;

(54) Název vynálezu:

2-[2-[(2-Hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[[2-methylamino)ethyl]amino]indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-on, způsob jeho výroby a farmaceutické prostředky s jeho obsahem

(57) Anotace:

2-[2-[(2-Hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[[2-methylamino)ethyl]amino]indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-on vzorce I, způsob jeho výroby a farmaceutické prostředky s jeho obsahem. Tato sloučenina prokázala vysokou antitumorovou účinnost.



(I)

CZ 286654 B6

2-[2-[(2-Hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[[2-methylamino]ethyl]amino]indazolo[4,3-gh]-izochinolin-6(2H)-on, způsob jeho výroby a farmaceutické prostředky s jeho obsahem

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká 2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[[2-methylamino]ethyl]-amino]indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu, způsobu jeho výroby, jeho farmaceuticky přijatelných adičních solí s kyselinami a farmaceutického prostředku. Uvedené sloučeniny mají vysokou antitumorovou účinnost.

Dosavadní stav techniky

15 Některé 1,4-bis[(aminoalkyl)amino]antracen-9,10-diony ukázaly při klinických pokusech antitumorový účinek. Zvláště zajímavé jsou ametantron, 4-bis{[2-(2-hydroxyethylamino)ethyl]-amino}antracen-9,10-dion a mitoxantron, 5,8-dihydroxy-1,4-bis{[2-(2-hydroxyethylamino)ethyl]amino}antracen-9,10-dion (Zee-Chent a další, *J. Med. Chem.*, (1978), 21, 291 – 4; Cheng a další, „Progress in Medicinal Chemistry“, Ellis, G. P. a West, G. B., vyd.; Elsevier: Amsterdam, 1983; str. 20, 83 a tam uvedené odkazy). Mitoxantron je onkolytický prostředek se širokým spektrem, jehož aktivita je podobná aktivitě antracyklinového antibiotika doxorubicinu. Klinické testy ukázaly, že mitoxantron má zvláště slibné účinky při léčení pokročilého karcinomu prsu, akutní leukémie a lymfomu (Legha, *Drugs of Today*, (1984), 20, 629). Omezujícím aspektem těchto léků je kardiotoxicita, zvláště v případě mitoxantronu, a myelo-depresivní toxický účinek obou těchto látek. Navíc obě sloučeniny vykazují zkříženou rezistenci vůči buněčným histotypům s rezistencí proti doxorubicinu, která je zprostředkována zvýšenou expresí glykoproteinu P. Taková rezistence, nazývaná vícenásobná rezistence, zahrnuje velký počet antitumorových antibiotik, mezi nimi také amsacrin a podophyllo toxin a deriváty, a je jedním z hlavních důvodů selhání terapie při léčení pevných tumorů uvedenými antibiotiky.

30 Aby se předešlo těmto nedostatkům, byly připraveny některé antracendiony s modifikovaným chromoforem. Například EP-A-0 103 381 nárokuje 2-aminoalkyl-5-aminoalkylamino-antra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-ony (antrapyrazoly) s antitumorovým účinkem. Antitumorový účinek těchto sloučenin v předklinických testech popisuje H. D. Hollis Showalter a další (*J. Med. Chem.*, 30, 121 – 131 (1987)).

40 Antrapyrazoly však mají také toxické vedlejší účinky, jako je těžká leukopenie (stupeň W.H.O. 3 a 4) a neutropenie (stupeň W.H.O. 4), které byly příčinou omezení dávek při klinických testech ve fázi I a II s antrapyrazolem CI-941 [I. E. Smith a další, *J. Clin. Oncol.*, 9, 2141 až 2147 (1991)]. Navíc je léčení látkou CI-941 spojeno s výraznou nefrotoxicitou [D. Campling a M.E.C. Robbins, *Nephrotoxicity*, Peter H. Dekker Bach and., Pag. 345 – 352 (1991), New York: *vedi Chem. Abstracts* 116: 294n (1992) a tito autoři uvádějí, že poškození ledvin by mohlo působit při terapii antrapyrazolem klinické problémy. Navíc poslední práce [*Drugs of the Future*, 17, 725 (1992); Judson, I. R. a další, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 32, abstr. 1059 (1991)] ukazují, že antrapyrazol CI-941 indukuje u člověka nevratnou kardiotoxicitu, i když nebyly dosud hlášeny žádné náznaky akutních srdečních příhod.

Z uvedeného vyplývá, že je stále třeba vyvíjet další nové aktivní analogy.

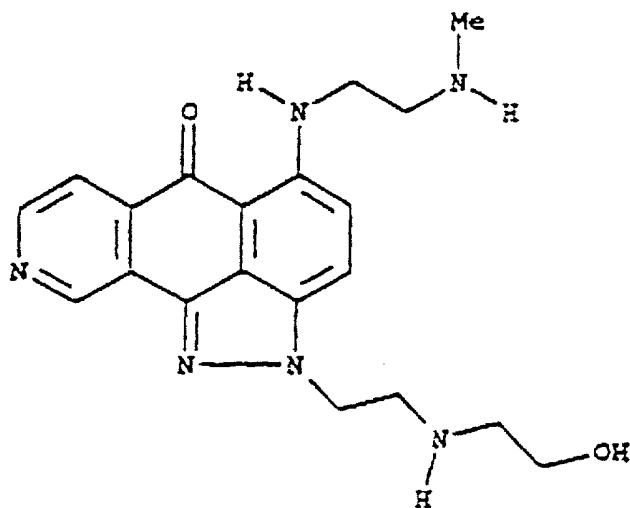
50 Aza-analogy antrapyrazolů, ve kterých byl zaveden atom dusíku v polohách 8- a 9-, se popisují v PCT/US93/08241 (publikovaná 31. 3. 1994, WO94/06795). Uvedené sloučeniny prokázaly vysoký antitumorový účinek jak v modelech *in vitro*, tak i *in vivo* a na rozdíl od doxorubicinu a mitoxantronu nevykazovaly zkříženou rezistenci v buněčné linii LoVo/DX. Tato data umožňují

předpokládat možný klinický účinek u leukémií a pevných tumorů citlivých na léčení antitumorovými antibiotiky.

Nyní bylo zjištěno, že překvapující účinky má 9-azaanalog antrapyrazolu, 2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[[[(2-methylamino)ethyl]amino]indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-on, čímž se podstatně liší od jiných derivátů této řady. Tato sloučenina má navíc ke zvýšení průměrného počtu přežití ošetřovaných zvířat (vyjádřeno jako procento T/C) proti jejím analogům prokázaný úplný ústup tumoru ve statisticky významném počtu zvířat, a proto se předpokládá její účinnost v klinických testech.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká 2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[[[(2-methylamino)ethyl]amino]indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu vzorce I a jeho farmaceuticky přijatelných adičních solí s kyselinou:

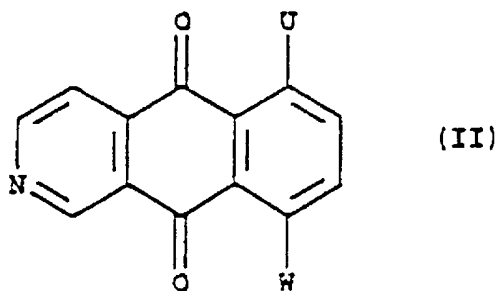


kde Me je methyl ve formě volné báze.

Příklady farmaceuticky přijatelných kyselin jsou: anorganické kyseliny jako kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová, dusičná, fosforečná, pyrofosforečná nebo organické kyseliny, jako kyselina octová, trifluorocetová, propionová, citronová, benzoová, mléčná, maleinová, jablečná, fumarová, jantarová, vinná, glutamová, asparagová, glukonová, askorbová, p-toluensulfonová, methansulfonová nebo jiné běžně používané kyseliny.

Vynález se zvláště týká trihydrochloridu 2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[[[(2-methylamino)ethyl]amino]indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu.

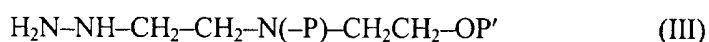
Sloučenina podle vynálezu může být připravena z meziprojektu vzorce II:



ve kterém U je zvoleno ze skupiny F, Cl, p-toluensulfonyloxy (OTs), methansulfonyloxy (OMs), zatímco W znamená F nebo Cl s podmínkou, že U a W nemohou být současně Cl,

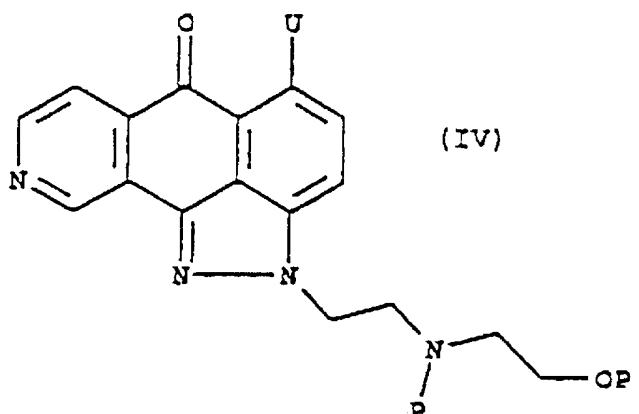
5

reakcí s hydrazinem vzorce III:



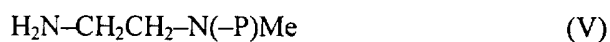
10 kde P a P' mohou být nezávisle na sobě atom vodíku nebo vhodná ochranná skupina stabilní při podmínkách reakce.

Výsledné sloučeniny vzorce IV:



15

se pak převádějí na sloučeniny vzorce I reakcí s aminy vzorce (V):

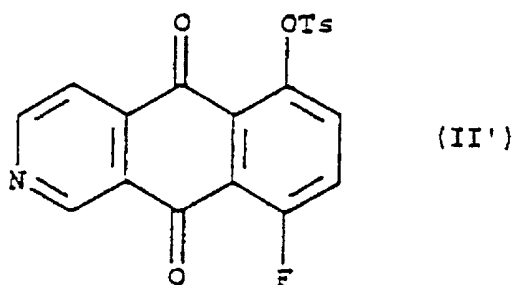


20

kde P má výše uvedené významy, a následným odštěpením přítomných ochranných skupin P a P'. V tomto případě bude získána sůl sloučeniny I, jejíž protiiont závisí na použité kyselině při odštěpování. Jestliže se použije nadbytku plynné kyseliny chlorovodíkové, sloučenina I se získá ve formě trihydrochloridu.

25

Výhodný způsob syntézy sloučeniny vzorce I je způsob zahrnující reakci meziproductu vzorce II':



s hydrazinem vzorce III a potom s aminem vzorce V a následné štěpení popřípadě přítomných ochranných skupin P a P'. Příklady ochranných skupin P a P' jsou: (C₁ – C₃)–acylové deriváty (s výhodou acetyl), (C₁ – C₄)–alkoxykarbonylové deriváty (s výhodou terc.–butoxykarbonyl) a (C₇ – C₁₀)–aralkoxy–karbonylové deriváty (s výhodou benzyloxykarbonyl).

Reakce meziproductů vzorce II s hydraziny vzorce III může být prováděna zahříváním meziproductů II se stechiometrickým množstvím nebo s nadbytkem hydrazinů III. Reakce se obvykle provádí v inertním rozpouštědle jako je methylenchlorid, chloroform, 1,1,1-trichlorethan, dimethoxyethan, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid, dimethylformamid, pyridin, pikolin, alkoholy (methanol, ethanol) nebo v jejich směsích (sloučeniny III mohou být alternativně použity samy jako rozpouštědlo) popřípadě v přítomnosti anorganické báze jako je uhličitán nebo hydrogenuhličitán alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin nebo organické báze jako je trialkylamin při teplotě v rozmezí od – 20 °C do teploty varu rozpouštědla. Reakce se s výhodou provádí v rozpouštědle jako je pyridin, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid nebo N,N,N',N'–tetramethylendiamin s použitím 2 až 10 ekvivalentů hydrazinů III a při teplotě mezi 5 °C a 50 °C.

Reakci meziproductu vzorce II' s hydraziny vzorce III je možno provádět s výhodou v rozpouštědle schopném rozpouštět reagentie, jako je směs tetrahydrofuranu a alkoholu (ethanol, methanol) a při teplotě v rozmezí – 10 °C až pokojová teplota.

Reakce sloučeniny vzorce IV s aminem vzorce V může být prováděna zahříváním sloučeniny IV se stechiometrickým množstvím nebo s nadbytkem aminu V. Reakce se obvykle provádí v inertním rozpouštědle jako je methylenchlorid, chloroform, 1,1,1-trichlorethan, dimethoxyethan, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid, dimethylformamid, pyridin, pikolin nebo jejich směsích, nebo v případě potřeby použitím aminu V samotného jako rozpouštědla, popřípadě v přítomnosti anorganické báze, jako je uhličitán nebo hydrogenuhličitán alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin nebo organické báze, jako je trialkylamin při teplotě v rozmezí 0 °C a teplota varu rozpouštědla.

Reakce se s výhodou provádí v rozpouštědle jako je pyridin, chloroform nebo dimethylsulfoxid s použitím 2 až 10 ekvivalentů aminu V a při teplotě v rozmezí mezi pokojovou teplotou a 100 °C.

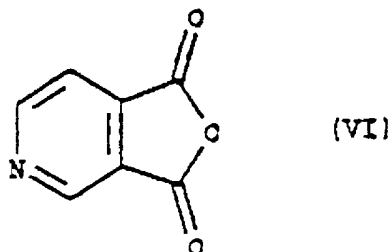
Reakce meziproductu vzorce IV, ve kterém U znamená OTs s aminem vzorce V, může být prováděna v rozpouštědlech jako je pyridin nebo dimethylsulfoxid a při teplotě mezi pokojovou teplotou a 100 °C.

Odštěpení přítomných ochranných skupin P a P' je možno provádět podle postupů známých odborníkům v oboru, například podle postupů popisovaných v Green, T. W., Wuts, P. G. M., „Protective Groups in Organic Synthesis“, druhé vydání, John Wiley & Sons, 1991.

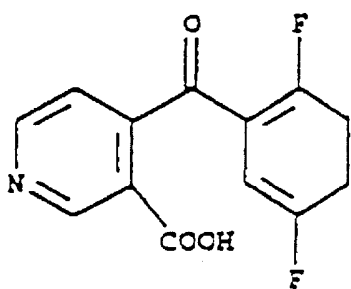
Odštěpování N-terc.-butoxykarbonylové skupiny je možno například provádět působením nadbytku bezvodého chlorovodíku na chráněný meziprodukt v rozpouštědle jako je ethanol, methanol, dichlormethan, chloroform nebo jejich směsích při teplotě v rozmezí od 20 °C do 50 °C a po dobu mezi několika minutami a několika hodinami.

5

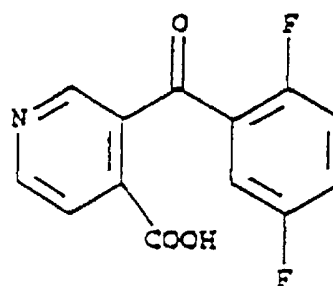
Sloučenina vzorce II' může být připravena ze sloučeniny VI:



- 10 Friedel-Craftsovou acylací 1,4-difluorbenzenu v přítomnosti AlCl_3 při teplotě přibližně 90 °C po dobu přibližně 22 hod, která vede k získání směsi prostorových izomerů (VIIa) a (VIIb):



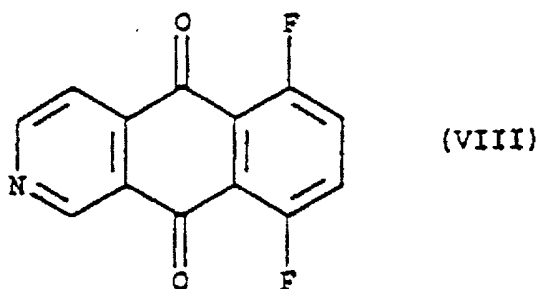
(VIIa)



(VIIb)

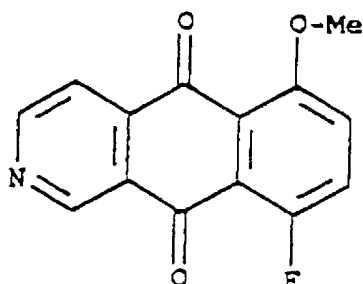
- 15 Alternativně je možno směs prostorových izomerů (VIIa) a (VIIb) získat reakcí meziproductu VI s 1-lithium-2,5-difluorbenzenem, připraveným reakcí 1,4-difluorbenzenu s alkyllithiem, jako je sek.-butyllithium v THF při nízké teplotě.

- 20 Směs prostorových izomerů VIIa a VIIb se potom cyklizuje oleem (20 % SO_3) při teplotě 130 až 140 °C za získání sloučeniny VIII:



Sloučenina vzorce VIII potom reaguje následujícím způsobem:

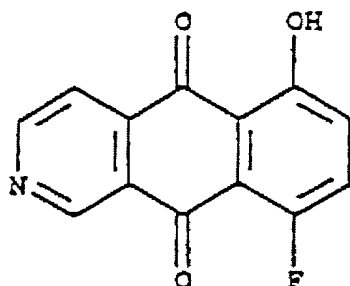
- a) reakce látky VIII s methoxidem sodným v methanolu a THF za získání meziprojektu IX:



(IX)

5

- b) demethylace methoxylové skupiny meziprojektu IX kyselinou methansulfonovou při teplotě přibližně 110 °C za získání, po krystalizaci z izopropylalkoholu meziprojektu X:



(X)

10

- c) reakce sloučeniny X s p-toluensulfonylchloridem v pyridinu při pokojové teplotě za získání požadovaného meziprojektu II'.

15 Meziprojekt vzorce II, ve kterém U znamená atom chloru a W znamená atom fluoru, může být připraven následujícími reakcemi:

- a) reakce 3-chlorpyridinu s oxidem uhličitým při teplotách mezi - 50 a až - 78 °C v inertním rozpouštědle jako je ether (THF) a v přítomnosti báze jako je butyllithium nebo diizopropylamid lithný za poskytnutí kyseliny 3-chlornikotin-4-karboxylové;

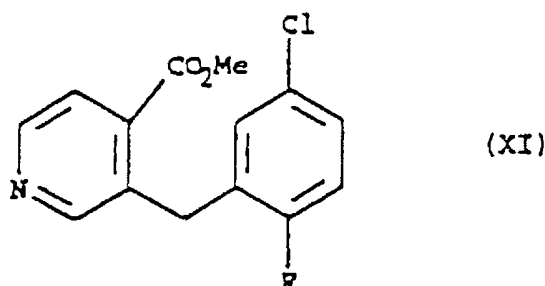
20

- b) esterifikace kyseliny 3-chlornikotin-4-karboxylové za poskytnutí methyl-3-chlorizonicotinátu. Jako reakčního činidla je možno použít diazometanu v inertním rozpouštědle, jako je ethylether;

25

- c) reakce methyl-3-chlorizonicotinátu s organozinečnatou sloučeninou (získané z 2-fluoro-5-chloro- α -bromotoluenu a reaktivního zinku v THF při teplotě přibližně 0 °C; Knochel, P a další, Chem. Rev. 93, 2117 - 2188 (1993); Negishi a další, J. Org. Chem., 42, 1821 - 1823 (1977), v přítomnosti dichlorbis(trifenylfosfin)niklu jako katalyzátoru za získání meziprojektu vzorce XI:

30



Uvedenou reakci je možno provádět v inertním rozpouštědle jako je ether (THF) a při teplotách mezi $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotou místnosti;

5

d) hydrolyza methylesteru meziproductu XI za poskytnutí odpovídajícího kyselinového derivátu. Podmínky použité při hydrolyze využívají hydroxidu alkalického kovu například hydroxidu sodného ve vodném a/nebo alkoholovém médiu a při teplotách v rozmezích teploty místnosti a teploty varu rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel;

10

e) cyklizace kyseliny získané v kroku d) za poskytnutí meziproductu II, kde U znamená atom chloru a W znamená atom fluoru, v přítomnosti dýmavé kyseliny sírové a/nebo olea a při teplotách mezi 100 a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

15

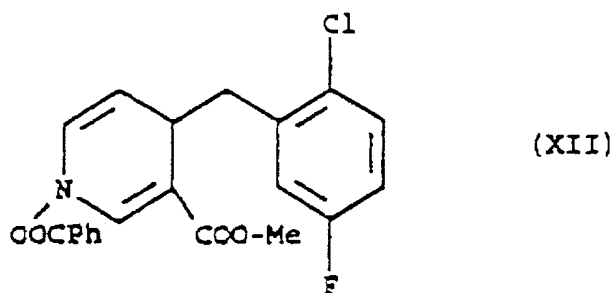
Alternativně může být meziproduct vzorce II, ve kterém U znamená atom chloru a W znamená atom fluoru získán následujícím postupem:

20

a) bromace 2-chlor-5-fluortoluenu N-bromsukcinimidem v přítomnosti katalytických množství aza-izobutyronitrilu nebo dibenzoylperoxidu v inertním rozpouštědle jako je chlorid uhličitý a při teplotě v rozmezí od teploty místnosti do $80\text{ }^{\circ}\text{C}$;

25

b) reakce α -brom-2-chlor-5-fluortoluenu získaného v kroku (a) v tetrahydrofuranu s aktivovaným zinkem; následující reakce získané organozinečnaté sloučeniny s n-fenoxykarbonylnikotiniumchloridem (získaným naopak z methylnikotinátu acylací fenylochloformátem v tetrahydrofuranu) za získání meziproductu XII:



30

Uvedená reakce může být prováděna při teplotách mezi $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotou místnosti:

35

c) aromatizace dihydropyridinového kruhu na pyridin v meziproductu XII, například sírou v dekalinu pod zpětným chladičem;

d) hydrolyza methylesteru alkoholickým roztokem hydroxidu alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin. Jako reakční činidlo může být použito například hydroxidu sodného v methanolu;

e) cyklizace derivátu kyseliny získaného v kroku d) v oleu (20 % SO₃ při vysokých teplotách (100 až 150 °C) za získání meziprojektu (II).

5 Sloučenina vzorce VI může být získána z kyseliny 3,4-pyridindikarboxylové (je komerčně dostupná) reakcí s vhodným dehydratačním činidlem, jako je anhydrid karboxylové kyseliny (anhydrid kyseliny octové nebo trifluoroctové), karbodiimid (N,N'-dicyklohexylkarbodiimid) nebo podobnými látkami. Výhodný způsob je působení acetanhydridu při přibližně 110 °C na kyselinu 3,4-pyridindikarboxylovou. Soli sloučeniny vzorce I je možno přeměnit na jiné známými způsoby.

10 Biologická účinnost sloučeniny podle vynálezu

Vyhodnocení biologické účinnosti sloučeniny podle předkládaného vynálezu bylo prováděno „in vitro“ a „in vivo“ podle protokolů vyvinutých U. S. National Cancer Institute.

15 Hodnocení cytotoxické účinnosti „in vitro“ bylo prováděno s použitím buněčné linie lidského adenokarcinomu tlustého střeva (Lovo) izolované z metastatické uzliny. Sloučenina byla testována testem MTT (Mosman, T. „Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival; Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay“, J. Immunol. Methods, (1983), 65, 55 – 63; Green, L. M., „Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability; Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines“, J. Immunol. Methods, (1984), 20 70, 257 – 268) ve srovnání s mitoxantronem, doxorubicinem a CI-941. Jak se uvádí v tabulce I, sloučenina podle vynálezu měla srovnatelnou aktivitu s doxorubicinem.

25 Studie biologické účinnosti „in vivo“ byly prováděny s použitím modelu myši leukémie P 388. Buňky P 388 myši leukémie byly intravenózně injikovány myši CD2F1. Léčení bylo zahájeno přibližně 24 hod po transplantaci tumoru a dávky produktu byly podle předem určených protokolů podávány i. v. obvykle v intervalech tří dnů. Studie byly prováděny v průběhu 60 dnů a bylo zaznamenáno datum uhynutí každého zvířete. Procento T/C bylo stanoveno s použitím 30 střední doby přežití (MST) pro každou skupinu podle vzorce

$$T/C \% = [(MST_{\text{ošetřené}})/(MST_{\text{kontroly}})] \times 100.$$

35 Sloučenina podle vynálezu se ukázala jako účinná při zvyšování doby přežití ošetřených zvířat ve srovnání s kontrolami (neošetřená zvířata). Navíc se sloučeniny podle vynálezu ukázaly být lépe tolerovány než mitoxantron (tabulka II).

40 Dále byly prováděny studie biologické účinnosti sloučeniny podle vynálezu *in vivo* s použitím dvou lidských tumorových xenograftů, lidského tumoru prsu MX-1 a tumoru ovárií A2780 (tabulka II). Sloučenina podle vynálezu prokázala aktivitu, vyjádřenou jako „inhibice hmotnosti tumoru“, stejnou nebo vyšší než látka CI-941. „Inhibice hmotnosti tumoru“ může být stanovena následujícím způsobem:

$$45 \quad TWI \% = 100 - [(\text{průměrná relativní hmotnost tumoru}_{\text{ošetřené}} / \text{průměrná relativní hmotnost tumoru}_{\text{kontrola}}) \times 100]$$

Navíc vykazovala sloučenina podle vynálezu na rozdíl od látky CI-941 výrazný počet úplného ústupu tumoru v testovaných dávkách, aniž by došlo k projevu toxických účinků. Ústupem tumoru se míní snížení hmotnosti tumoru měřené 30 dnů po konci ošetření ve srovnání s počáteční hmotností tumoru. Úplný ústup tumoru znamená zmizení hmoty tumoru.

Na základě ukázaných výsledků se proto u sloučeniny podle vynálezu očekává, že bude u člověka aktivní proti leukémiím a pevným tumorům citlivým na léčení antitumorovými antibiotiky a antracendiony.

- 5 Sloučenina podle vynálezu může být proto používána jako aktivní složka v léčivých prostředcích pro potlačování a/nebo léčení tumorů u savců při podávání v množstvích v rozmezí mezi 0,5 a 20 mg/kg tělesné hmotnosti. Výhodný dávkovací režim může být mezi 1 a 18 mg/kg tělesné hmotnosti savce. Zvláště výhodný dávkovací režim u člověka by mohl být v rozmezí 5 a 200 mg/m² povrchu těla.

10

Dávka by měla být upravena tak, aby byla kompatibilní s jiným léčením, například radioterapií.

- 15 Tabulka I – Vyhodnocení sloučeniny podle vynálezu vzorce I, mitoxantronu, doxorubicinu a CI-941 biologickým testem in vitro u buněčné linie lidského adenokarcinomu tlustého střeva (LoVo) 1 h po podání léčiva.

Sloučenina	IC ₅₀ ± S.D. (μg/ml)
Sloučenina I	0,54 ± 0,17
Mitoxantron	0,026 ± 0,017
Doxorubicin	0,7 ± 0,49
CI-941	0,039 ± 0,035

- 20 Tabulka II – Vyhodnocení sloučeniny podle vynálezu vzorce I, mitoxantronu a CI-941 biologickým testem *in vivo* proti myši leukémii P388 a xenograftům lidského tumoru (MX-1 a A 2780) na modelu myši

Sloučenina	P388 iv/iv+1,4,7			MX-1 sc/iv q7dx3			A 2780 sc/iv q4dx3			Regrese tumoru
	dávka (mg/kg)	T/C %	Tox.	dávka (mg/kg)	TWI %	Tox.	dávka (mg/kg)	TWI %	Tox.	
Sloučenina I	7,5	167	0/8	8,9	78	0/5	7,5	99	0/7	4/7
Mitoxantron	3	195	16/284	17,5	96	0/5	9,7	199	0/7	6/7
CI-941	6	133	0/8	4,5	74	16/60	–	–	–	–
	9	144	0/8	9	83	0/7	8	87	0/7	0/7
	13,5	133	0/8	13,5	93	0/40	10,4	97	0/7	0/7
				17,5	97	9/33	13,5	100	5/7	1/7

- 25 V rámci vynálezu jsou také zahrnuty farmaceutické prostředky obsahující sloučeninu vzorce I. Tyto farmaceutické prostředky mohou obsahovat jakékoliv množství sloučeniny vzorce I schopné vyvolávat antitumorový účinek u savců proti tumoru citlivému na ošetření doxorubicinem, antracendiony a antrapyrazoly.

- 30 Farmaceutické prostředky mohou obsahovat navíc ke sloučenině vzorce I farmaceuticky přijatelné pomocné látky, vhodné pro jakoukoliv cestu podávání, jako je podávání orální, parenterální, intravenózní, endodermické, subkutánní nebo místní, v kapalně nebo pevně formě. Cestou podávání sloučeniny vzorce (I) je cesta orální. Orální prostředky budou obecně obsahovat inertní ředivo nebo jedlý nosič. Mohou být obsaženy v želatinových kapslích nebo slisovány do tablet. Jiné orální formy podávání jsou kapsle, pilulky, elixíry, suspenze nebo sirupy.

- 35 Tablety, pilulky, kapsle a podobné prostředky mohou obsahovat následující složky (navíc k aktivní složce): pojivo, jako je mikrokrytalická celulóza, tragakant nebo želatina; plnivo jako je škrob nebo laktóza; rozvolňovací prostředek, jako je kyselina alginová, primogel, kukuřičný škrob apod.; kluznou látku, jako je stearan hořečnatý; prostředek pro zlepšení tokových

40

vlastností, jako je koloidní oxid křemičitý, sladidlo jako je sacharóza nebo sacharin, nebo ochucovací prostředek jako je mátová příchut', salicylan methylnatý nebo pomerančová příchut'. Jestliže je zvolený prostředek ve formě kapslí, může obsahovat navíc kapalný nosič, jako je olej. Další prostředky mohou obsahovat různé materiály, které mění jejich fyzikální formu, například potahovací látky (pro tablety a pilulky) jako je cukr nebo šelak. Materiály použité při výrobě prostředků by měly být farmaceuticky čisté a v použitých dávkách netoxické.

Pro výrobu farmaceutických prostředků pro parenterální podávání může být aktivní složka součástí roztoků nebo suspenzí, které mohou navíc obsahovat následující složky: sterilní ředivo jako je voda pro injekce, fyziologický roztok, oleje, polyethylenglykoly, glycerol, propylenglykol nebo jiná syntetická rozpouštědla; antibakteriální látky jako je benzylalkohol; antioxidanty jako kyselina askorbová nebo hydrogensířičitan sodný; chelatační prostředky jako kyselina ethylen-diamintetraoctová; pufrý jako acetáty, citráty nebo fosfáty a prostředky pro nastavení osmotického tlaku roztoku, jako je chlorid sodný nebo dextróza. Parenterální prostředky mohou být přítomny v ampulích, stříkačkách pro jedno použití, skleněných nebo plastických lahvičkách.

Příklady provedení vynálezu

20 Syntéza sloučeniny podle vynálezu

Výroba 1 – anhydrid kyseliny 3,4-pyridindikarboxylové VI

25 Směs kyseliny 3,4-pyridindikarboxylové (15 g) a acetanhydridu (30 ml) se vaří 2 h pod zpětným chladičem. Acetanhydrid v nadbytku se oddestiluje a zbytek se čistí sublimací (123 °C při 399 Pa) za poskytnutí 10,1 g anhydridu kyseliny 3,4-pyridindikarboxylové jako bílé pevné látky, teplota tání 74 až 76 °C.

30 ¹H-NMR (200 MHz) v CDCl₃: 7,94 ppm (d, 1H); 9,24 ppm (d, 1H); 9,39 ppm (s, 1H).

Výroba 2 – směs VIIa a VIIb

35 Směs anhydridu kyseliny 3,4-pyridindikarboxylové (5 g) a chloridu hlinitého (17,5 g) v 1,4-difluorbenzenu (65 ml) se zahřívá na olejové lázni 22 h při 110 °C. Nadbytek 1,4-difluorbenzenu se oddělí destilací. Zbytek se ochladí na ledové lázni a přidá se 75 ml směsi voda/led a koncentrovaná kyselina chlorovodíková (6,3 ml). Vysrážená pevná látka se odfiltruje a suší za poskytnutí směsi kyseliny 4-(2,5-difluorbenzoyl)-nikotinové a kyseliny 3-(2,5-difluorbenzoyl)-izonikotinové v poměru přibližně 4 : 1 (7,7 g) jako bílého prášku, který může být rekrystalizován z acetonitrilu a vody; teplota tání 214 až 217 °C.

¹H-NMR (200 MHz) v d₆-DMSO: 7,4 ppm (m); 7,5 ppm (m); 7,9 ppm (m); 8,8 ppm (d); 8,9 ppm (d); 9,15 ppm (s).

45 Výroba 3 – 6,9-difluorbenzo[g]izochinolin-5,10-dionu II'

50 Roztok směsi VIIa a VIIb z výroby 2 (61,07 g) v oleu (20 % SO₃, 100 ml) se zahřívá na 140 °C a další oleum se přidává ve čtyřech dílech (vždy 13,2 ml) ve 20 min intervalech. Po posledním přidávku se směs zahřívá dalších 20 min, potom se ochladí na teplotu místnosti a přidá se směs ledu (1500 ml), vody (1500 ml) a 35 % hydroxidu sodného (350 ml). Směs se extrahuje methylenchloridem (1 x 1000 ml a potom 3 x 500 ml). Spojené organické extrakty se promyjí vodou (2 x 1000 ml), suší nad síranem sodným a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Získaná tmavě červená pevná látka (56 g) se rozpustí v horkém THF (840 ml) a odbarví aktivním

uhlím (8,4 g). Po 30 min se ještě horká směs filtruje a filtrát se koncentruje na objem 200 ml. Výsledná sraženina se oddělí filtrací za získání 43 g produktu, teplota tání 201 až 203 °C.

5 Koncentrací matečných louhů na objem 70 ml se získá druhá dávka produktu (3,35 g), teplota tání 200 až 202 °C.

Výroba 4 – 9-fluor-6-methoxybenzo[g]izochinolin-5,10-dionu

10 Roztok methoxidu sodného, čerstvě připraveného v atmosféře dusíku z bezvodého methanolu (97,6 ml) a sodíku (2,024 g) se přikapává v průběhu 2 h a 35 min do roztoku 6,9-difluorbenzo[g]izochinolin-5,10-dionu (19,615 g, výroba 3) v bezvodém THF (883 ml) za míchání při pokojové teplotě. Na konci přidávání se reakční směs koncentruje na polovinu výchozího objemu a potom se udržuje 30 min při 18 °C. Oddělená pevná látka se zfiltruje a promyje 100 ml THF, potom se suspenduje ve vodě (80 ml), ponechá za míchání přes noc
15 a opět se filtruje za poskytnutí 9,3 g surového produktu, který se suspenduje v methylenchloridu (45 ml) a vaří 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení na teplotu místnosti se produkt zfiltruje a oddělená pevná látka se promyje methylenchloridem (5 x 3 ml), potom suší ve vakuu při 40 °C za získání 8,65 g čistého produktu, teplota tání 248 až 250 °C.

20 ¹H-NMR (200 MHz) v CDCl₃: 4,05 ppm (s, 3H); 7,40 ppm (dd, J = 9,39, 3,91 Hz, 1H); 7,55 ppm (dd, J = 10,37, 9,39 Hz, 1H); 8,00 ppm (dd, J = 5,09, 0,78 Hz, 1H); 9,05 ppm (d, J = 5,09 Hz, 1H); 9,48 ppm (d, J = 0,78 Hz, 1H).

Výroba 5 – 9-fluoro-6-hydroxybenzo[g]izochinolin-5,10-dionu

25 Směs 29 g 9-fluoro-6-methoxybenzo[g]izochinolin-5,10-dionu a 145 ml kyseliny methan-sulfonové se zahřívá při 110 °C za míchání v atmosféře inertního plynu po dobu přibližně 2 h a potom se přidá 3000 ml vody. Po 1 h za míchání se vytvořená sraženina zfiltruje, promyje přibližně 300 ml vody, převede do dalších 2000 ml vody a po míchání po dobu 30 min se znovu
30 zfiltruje. Matečné louhy se extrahují 500 ml ethylacetátu. Organická fáze se oddělí a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Zbytek (3 g) se spojí s prvním krystalizačním podílem a celek se převede do 500 ml izopropylalkoholu. Po 1 h míchání se krystalizovaný produkt zfiltruje za získání 24,16 g produktu, teplota tání 189 až 192 °C.

35 Výroba 6 – 9-fluoro-6-(p-toluensulfonyloxy)benzo[g]izochinolin-5,10-dionu

Roztok 9-fluoro-6-hydroxybenzo[g]izochinolin-5,10-dionu (18 g) a triethylaminu (17,51 ml) v methylenchloridu (540 ml) se smísí s 21,37 g tosylchloridu při teplotě místnosti za míchání
40 a v atmosféře inertního plynu. Po přibližně 8 h se reakční směs promyje 200 ml vody a promývací roztoky se extrahují methylenchloridem. Spojené organické fáze se suší nad síranem sodným a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku za získání 80 g zbytku. Tento zbytek se převede do 294 ml hexanu a ponechá za míchání při teplotě místnosti 1 h, potom se filtruje a promývá na filtru 200 ml hexanu. Výsledná pevná látka (29 g) se krystalizuje při 40 °C ze směsi methylenchloridu (160 ml) a izopropylalkoholu (60 ml). Horký roztok se přefiltruje přes filtr ze
45 skleněných vláken a zakoncentruje na zbytkový objem přibližně 120 ml. Produkt krystalizuje a po 2 h za míchání se filtruje za získání prvního podílu 12,92 g. Další koncentrací matečného louhu na polovinu objemu se získá druhý podíl produktu (7,65 g). Teplota tání je 170 až 172 °C.

50 Výroba 7 – 2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-(p-toluensulfonyloxy)indazolo[4,3-g]hizochinolin-6(2H)-onu

Roztok N-[2-[(2-hydroxyethylamino)ethyl]]hydrazinu (J. Het. Chem., 26, 85 (1989); 0,179 g) v absolutním ethanolu (0,5 ml) se přikapává do roztoku 9-fluoro-6-(p-toluensulfonyloxy)benzo-

[g]izochinolin-5,10-dionu (0,2 g; výroba 6) a triethylaminu (0,073 g) ve 2 ml THF se udržuje za míchání při pokojové teplotě. Po 2 h se přidá druhá část N-[2-[(2-hydroxyethylamino)ethyl]-hydrazinu (0,179 g) v 0,5 ml absolutního ethanolu a po dalších 2 h se reakční směs koncentruje na objem přibližně 1 ml. Přidá se 20 ml vody a výsledná směs se udržuje za míchání přes noc při teplotě místnosti, potom se odfiltruje oddělená pevná látka, suší ve vakuu při 40 °C a nakonec převede do horkého ethylacetátu za získání 0,06 g produktu, teplota tání 131 až 133 °C.

¹H-NMR (200 MHz) v d₆-DMSO/D₂O: 2,45 ppm (s, 3H); 2,62 ppm (t, 2H); 3,13 ppm (t, 2H); 3,40 ppm (t, 2H); 4,65 ppm (t, 2H); 7,25 ppm (d, 1H); 7,40 ppm (d, 2H); 7,75 ppm (d, 2H); 7,95 ppm (d, 1H); 8,15 ppm (d, 1H); 8,80 ppm (d, 1H); 9,40 ppm (s, 1H).

Výroba 8 – 2-[2-[N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-(p-toluensulfonyloxy)izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu

Roztok diterc.-butyldikarbonátu (1,12 g) v THF (20 ml) a vody (4 ml) se za míchání přidává v průběhu 2 min do 2,132 g pevného 2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-(p-toluensulfonyloxy)indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu po částech. Reakční směs se udržuje při pokojové teplotě za míchání 1 h a potom se koncentruje na malý objem. Zbytek se opakovaně převede do ethanolu a koncentruje téměř dosucha, čímž se odstraní zbytky vody. Získaná pevná látka se roztírá s horkým methylterc.-butyletherem a potom se přidá methylenchlorid pro dokončení rozpouštění pevné látky. Methylenchlorid se potom v mírném proudu dusíku oddestiluje. Směs se ponechá chladit při teplotě místnosti a pevná látka se oddělí filtrací, promyje nadbytkem methylterc.-butyletheru a suší ve vakuu při 40 °C. Získá se 1,91 g produktu jako zelené pevné látky s teplotou tání 175 až 185 °C.

¹H-NMR (200 MHz, 323°K) v d₆-DMSO: 9,43 ppm (s, 1H); 8,85 ppm (d, 1H); 8,17 ppm (d, 1H); 7,98 ppm (d, 1H); 7,78 ppm (d, 2H); 7,50 – 7,30 ppm (m, 3H); 4,80 ppm (t, 2H); 4,67 ppm (br. s, 1H); 3,75 ppm (br. s, 2H); 3,57 – 3,35 ppm (br. m, 2H); 3,30 – 2,95 ppm (br. m, 2H); 2,38 ppm (s, 3H); 1,17 ppm (br. s, 4H); 0,90 ppm (br. s, 5H).

Výroba 9 – 2-[2-[N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[(N-methyl-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino)-ethylamino]izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu

Směs 2-[2-[N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-(p-toluensulfonyloxy)izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu (0,74 g) a N-methyl-N-BOC ethylen-diaminu (1,561 g; Saari, W. S. a další, J. Med. Chem., 33, 97 – 101 (1989) v 6 ml pyridinu se zahřívá 6 h 30 min při teplotě 65 °C. Veškerá pevná látka se rozpustí. Roztok se zahřívá 2 h 30 min při 100 °C a reakční směs se koncentruje na malý objem. Zbytek se převede do 100 ml methylenchloridu a 50 ml 1N vodného roztoku hydroxidu sodného a potom se oddělí bazická vodná fáze a extrahuje methylenchloridem (2 x 50 ml). Organické extrakty se promyjí směsí vody (50 ml) a nasyceného roztoku NaH₂PO₄ (25 ml) suší nad síranem sodným a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Zbytek (950 mg) se čistí chromatografií na silikagelu (70 g; eluent methylenchlorid/methanol 97 : 3 – 95 : 5) za získání 585 mg produktu jako oranžové pěny.

¹H-NMR (200 MHz, 333°K) v d₆-DMSO: 1,17 ppm (s br., 9H); 1,33 ppm (s, 9H); 2,87 ppm (s, 3H); 3,05 – 3,20 ppm (m, 2H); 3,45 ppm (q, 2H); 3,52 ppm (t, 2H); 3,72 ppm (q, 2H); 3,76 ppm (t, 2H); 4,46 ppm (t br., 1H); 4,76 ppm (t, 2H); 7,27 ppm (d, 1H); 7,98 ppm (d, 1H); 8,20 ppm (dd, 1H); 8,79 ppm (d, 1H); 9,20 ppm (t br., 1H); 9,51 ppm (d, 1H).

Výroba 10 – 2-[2-[N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[(N-methyl-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino)-ethylamino]izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu

5 Roztok N-methyl-N-BOC ethylendiaminu (2,12 g) v 7 ml bezvodého pyridinu se smísí s 710 mg 2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-(p-toluensulfonyloxy)indazolo[4,3-g]izochinolin-6(2H)-onu (výroba VII) a reakční směs se zahřívá za míchání při 50 °C v atmosféře dusíku 22 h. Potom se směs zahřívá ještě další hodinu při 70 °C a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku při 40 °C. Zbytek se rozdělí mezi 25 ml 0,1N hydroxidu sodného a 75 ml methylenchloridu a potom se vodná fáze extrahuje methylenchloridem (2 x 25 ml). Spojené organické fáze se 10 dvakrát promyjí roztokem soli (25 ml), suší nad síranem sodným a roztok se odpařuje za sníženého tlaku za získání 2 g hnědého oleje. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (50 g; eluce methylenchlorid/methanol/hydroxid amonný 95 : 5 : 0 – 85 : 15 : 0,6) a následnou krystalizací z roztoku methylenchlorid/methylterc.-butylether za získání 339 mg produktu. Teplota tání je 139,5 až 141,5 °C.

15 ¹H-NMR (200 MHz) v CDCl₃: 1,48 ppm (s, 9H); 2,85 ppm (t, 2H); 2,94 ppm (s, 3H); 3,30 ppm (t, 2H); 3,50 – 3,75 ppm (m, 6H); 4,66 ppm (t, 2H); 6,95 – 7,20 ppm (m, 1H); 7,70 ppm (d, 1H); 8,27 ppm (d, 1H); 8,80 ppm (d, 1H); 9,28 ppm (t br., 1H); 9,51 (d, 1H).

20 **Příklad 1**

Trihydrochlorid 2-[2-[N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[(N-methylamino)ethylamino]izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu

25 Roztok 2-[2-[N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]-N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[(N-methyl-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino)-ethylamino]izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu (563 mg; výroba 9) ve 20 ml absolutního ethanolu byl smísen s 5 ml 4,11M roztoku chlorovodíku v absolutním ethanolu. Výsledný tmavě červený roztok se udržuje při teplotě 30 místnosti za míchání v atmosféře dusíku přibližně 20 h. Vytvořená červená pevná látka se odfiltruje, důkladně promyje ethanolem a suší ve vakuu při 50 °C za získání 414 mg produktu. Teplota tání je 220 až 222 °C (za rozkladu).

35 ¹H-NMR (200 MHz) v D₂O: 2,80 ppm (s, 3H); 3,35 ppm (q, 2H); 3,45 ppm (t, 2H); 3,83 ppm (t, 2H); 3,87 – 3,93 ppm (m, 2H); 4,00 ppm (t, 2H); 4,97 ppm (t, 2H); 7,11 ppm (d, 1H); 7,91 ppm (d, 1H); 8,39 ppm (d, 1H); 8,77 ppm (d, 1H); 9,34 ppm (s, 1H).

40 **Příklad 2**

Trihydrochlorid 2-[2-[N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[(N-methylamino)ethylamino]izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu

45 Suspenze 2-[2-[N-(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-5-[(N-methyl-N-[(1,1-dimethylethoxy)karbonyl]amino)-ethylamino]izochino[8,7,6-cd]indazolo-6(2H)-onu (320 mg; výroba 10) ve 14 ml absolutního ethanolu se v průběhu minuty přidává do 5 ml 6,5 M roztoku chlorovodíku v absolutním ethanolu při udržování teploty na přibližně 0 °C. Vznikne červená tuhá sraženina, která se částečně rozpouští přidávkem 1,5 ml vody. Reakční směs se udržuje při teplotě místnosti 50 přibližně 23 h, potom se zahřívá přibližně 2 h při 55 °C. Potom se červená sraženina odfiltruje v atmosféře dusíku, promyje ethanolem a suší ve vakuu 1 h při 40 °C a potom při pokojové teplotě. Získá se 271 mg produktu jako červené pevné látky, teplota tání 220 až 222 °C (za rozkladu).

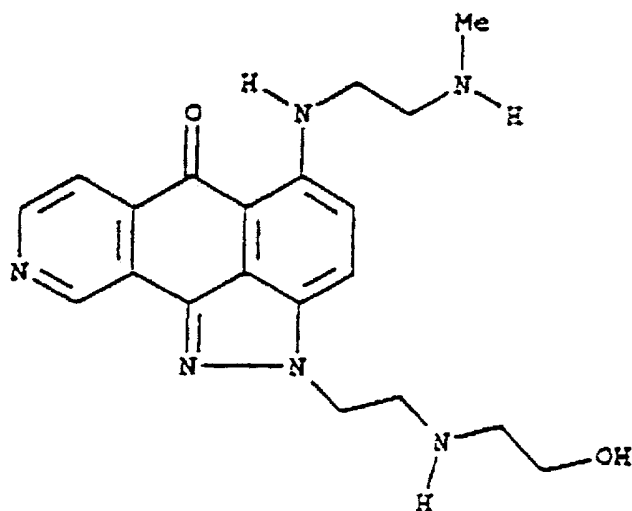
^1H -NMR (200 MHz) v D_2O : 2,80 ppm (s, 3H); 3,35 ppm (q, 2H); 3,45 ppm (t, 2H); 3,83 ppm (t, 2H); 3,87 – 3,93 ppm (m, 2H); 4,00 ppm (t, 2H); 4,97 ppm (t, 2H); 7,11 ppm (d, 1H); 7,91 ppm (d, 1H); 8,39 ppm (d, 1H); 8,77 ppm (d, 1H); 9,34 ppm (s, 1H).

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Derivát indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu vzorce I:



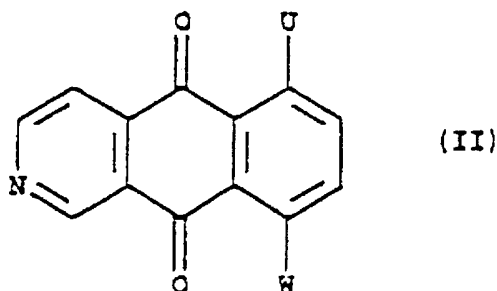
(I)

15 kde Me znamená methyl, ve formě volné báze a její farmaceuticky přijatelné adiční soli s kyselinou.

20 2. Derivát indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu podle nároku 1 vzorce I ve formě trihydrochloridu.

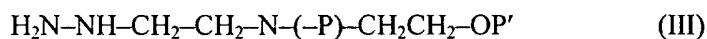
3. Způsob výroby derivátu indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelných solí, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje následující kroky:

25 (a) reakci meziprojektu vzorce II:

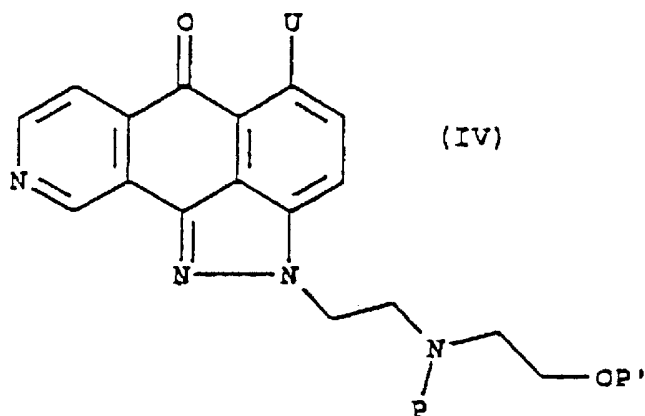


(II)

30 kde U je zvoleno ze skupiny fluor, chlor, paratoluensulfonyloxy, methansulfonyloxy a W je atom fluoru nebo chloru s podmínkou, že U a W nemohou být současně atom chloru, s hydrazinem vzorce III:



5 kde P a P' mohou být nezávisle atom vodíku nebo vhodná ochranná skupina stabilní za podmínek reakce, za vzniku meziproductu vzorce IV,



10 kde jednotlivé substituenty mají výše uvedený význam

(b) reakci meziproductu vzorce IV získaného v kroku (a) s aminem vzorce V:



15 kde P je definováno výše;

za vzniku derivátu indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu vzorce I podle nároku 1.

20 4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že v kroku (a) se použije meziproductu vzorce II, ve kterém U je para-toluensulfonyloxy a W je atom fluoru.

25 5. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje derivát indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu podle nároků 1 až 2 ve směsi s vhodnými nosiči nebo pomocnými látkami.

6. Použití derivátu indazolo[4,3-gh]izochinolin-6(2H)-onu podle nároků 1 až 2 pro výrobu farmaceutického prostředku s antitumorovým účinkem.

30

Konec dokumentu

35