

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-1315

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (22) Přihlášeno: **19.11.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.11.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/253513**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 4/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/IB2001/002193**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/044158**

(51) Int. Cl.⁷ :
C 07 D 417/12
C 07 D 275/03
A 61 K 31/425
A 61 K 31/4025
A 61 P 35/00

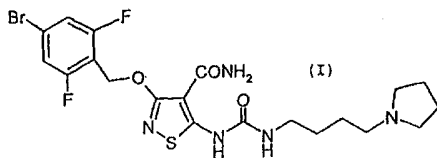
(71) Přihlašovatel:
PFIZER PRODUCTS INC., Groton, CT, US

(72) Původce:
Gant Thomas G., Groton, CT, US
Williams Glenn Robert, Groton, CT, US

(74) Zástupce:
Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Soli isothiazolkarboxamidu a jejich použití jako
prostředků proti hyperproliferaci**

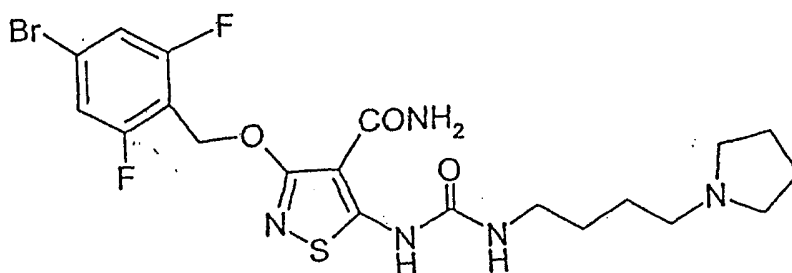
(57) Anotace:
Předložené řešení se týká hydrochloridu, hydrobromidu, hemicitrátu, acetátu, p-tosylátu, L-tartrátu, hemisukcinátu a mesylátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny. Řešení se také týká farmaceutických kompozic obsahujících hydrochlorid, hydrobromid, hemicitrát, acetát, p-tosylát, L-tartrát, hemisukcinát a mesylát sloučeniny vzorce I. Řešení se dále týká způsobu léčení hyperproliferativních onemocnění, jako je rakovina, u savců, zejména u člověka podáváním výše uvedených solí a způsobů přípravy a krystalických forem výše uvedených solí.



Soli isothiazolkarboxamidu a jejich použití jako prostředků
proti hyperproliferaci

Oblast techniky

Předložený vynález se týká soli amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(pyrrolidin-1-yl-butyl)-ureido]-isothiazol-4-karboxylové kyseliny vzorce I:



(I)

Vzorec I ve formě volné fáze je popsán v souběžné US přihlášce No.09/316|837, podané 21.5.1999, jejíž odhalení je zde začleněno odkazem jako celek. Dřívější přihláška je ppstoupěna společně s předloženou přihláškou. Volná báze vzorce I je užitečná pro léčení hyperproliferativních chorob, jako je rakovina.

Předložený vynález poskytuje hydrochlorid, hydrobromid, hemicitrát, acetát, p-tosylát, L-tartrát, hemisukcinát, a mesylát vytvořený z amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]-isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

Předložený vynález se dále týká způsobu výroby hydrochloridu, hydrobromidu, hemicitrátu, acetátu, *p*-tosylátu, *L*-tartrátu, hemisukcinátu a mesylátu vytvořeného z amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny. Vynález se také týká farmaceutických kompozic obsahujících hydrochlorid, hydrobromid, hemicitrát, acetát, *p*-tosylát, *L*-tartrát, hemisukcinát a mesylát sloučeniny vzorce I. Soli podle předloženého vynálezu jsou užitečné pro léčení hyperproliferativních chorob, jako je rakovina u savců, zejména u člověka. Vynález se rovněž týká způsobů podávání solí vzorce I při léčení hyperproliferativních chorob.

Stručný popis obrázků

Obr. 1. je rentgenové práškové difrakční spektrum hydrochloridu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 2.

Obr. 2. je rentgenové práškové difrakční spektrum hydrobromidu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 3.

Obr. 3. je rentgenové práškové difrakční spektrum hemicitrátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-

-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 4.

Obr. 4. je rentgenové práškové difrakční spektrum acetátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 5.

Obr. 5. je rentgenové práškové difrakční spektrum *p*-tosylátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 6.

Obr. 6. je rentgenové práškové difrakční spektrum *L*-tartrátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 7.

Obr. 7. je rentgenové práškové difrakční spektrum hemisukcinátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, identifikovaného jako forma A, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 8.

Obr. 8. je rentgenové práškové difrakční spektrum hemisukcinátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-

-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, identifikovaného jako forma B, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 9.

Obr. 9. je rentgenové práškové difrakční spektrum mesylátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, který byl připraven a izolován způsobem podle předloženého vynálezu ilustrovaném v Příkladu 10.

V rentgenovém práškovém difrakčním spektru na Obr. 1-9 horizontální osa ukazuje úhel difrakce 2-theta stupňů a vertiální osa znázorňuje intenzitu difrakce v Cps.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká hydrochloridu, hydrobromidu, hemicitrátu, acetátu, p-tosylátu, L-tartrátu, hemisukcinátu a mesylátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny následujícího vzorce:

Předložený vynález se dále týká způsobů výroby hydrochloridu, hydrobromidu, hemicitrátu, acetátu, *p*-tosylátu, *L*-tartrátu, hemisukcinátu a mesylátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)-ureido]isothiazol-4-karboxylové zahrnujících reakci volné báze s jednou z výše uvedených solí v přítomnosti vhodného organického rozpouštědla.

Hydrochlorid, hydrobromid, hemicitrát, acetát, *p*-tosylát, *L*-tartrát, hemisukcinát a mesylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)-ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny byl charakterizován pomocí rentgenové práškové difraktometrie

Krystaly hydrochloridu, hydrobromidu, hemicitrátu, acetátu, *p*-tosylátu, *L*-tartrátu, hemisukcinátu (Formy A a B) a mesylátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny poskytují prášková rentgenová difrakční spektra v podstatě shodná jako jsou prášková rentgenová difrakční spektra na Obr. 1-9, jednotlivě. Avšak, je známo, že prášková rentgenová difrakční spektra mohou být získána s chybou měření závisující na podmínkách měření. Zejména, je obecně známo, že intenzity v práškovém rentgenovém difrakčním spektru se mohou měnit v závislosti na podmínkách měření. Proto je zřejmé, že soli podle předloženého vynálezu nejsou omezeny na krystaly, které vykazují práškové rentgenové difrakční spektrum naprosto shodné s práškovými rentgenovými difrakčními spektry na Obr. 1 -8, a že krystaly poskytující prášková rentgenová difrakční spektra v podstatě shodná, jako výše uvedená prášková rentgenová difrakční spektra spadají do rozsahu předloženého vynálezu. Odborníci v oboru rentgenové

práškové difraktometrie mohou snadno posoudit identitu rentgenových práškových difrakčních spekter

Obecně, chyba měření úhlu difrakce při běžné rentgenové práškové difraktometrii je asi 5 % nebo méně a tato chyba měření by měla být brána v úvahu, stejně jako u úhlů difrakce. Dále, by mělo být zřejmé, že intenzity se mohou měnit v závislosti na experimentu.

Hydrochlorid vytvořený ze sloučeniny vzorce I je charakteristický tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při úhlech difrakce asi 2-theta, [% relativní intenzity] : 8,623 [90,7], 12,121 [38,9], 17,298 [95,2], 23,397 [440,7], 23,944 [51,7], 24,119 [62,7], 24,873 [55,7], 25,948 [100] a 28,821 [39,6]. Hydrochlorid vyrobený podle předloženého vynálezu poskytuje práškové rentgenové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je práškové rentgenové difrakční spektrum na Obr. 1.

Charakteristické 2-theta (2 θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum hydrochloridu sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 1

2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)
6,225	10,5	17,298	95,2	23,397	44,7	28,821	39,6	33,407	10,4
8,623	90,7	17,868	17,6	23,944	51,7	29,438	19,0	33,778	15,3
12,121	38,9	18,712	17,1	24,119	62,7	30,543	15,3	34,920	10,5
12,522	16,8	18,880	14,2	24,873	55,7	31,144	8,7	35,273	9,4
12,873	6,0	19,549	13,8	25,948	100,0	31,757	8,7	36,321	13,6
14,206	4,7	20,552	8,5	27,216	12,6	32,348	14,6	38,409	15,5
15,951	5,1	21,896	22,2	28,146	6,0	32,640	11,4	39,500	9,9
16,736	12,4								

Tabulka 1

Hydrobromid vytvořený ze sloučeniny vzorce I je charakteristický tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při úhlech difrakce asi 2-theta, [% relativní intenzity]: 8,687 [100,0], 12,264 [35,9], 17,374 [42,3], 23,711 [24,0], 24,335 [20,7] a 25,769 [34,3]. Hydrobromid vyrobený podle předloženého vynálezu poskytuje práškové rentgenové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je práškové rentgenové difrakční spektrum na Obr. 2.

Charakteristické 2-theta (2θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum hydrobromidu sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 2

2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)
3,156		17,37	42,3	23,18	5,6	28,52	6,1	33,256	3,7
4,615	2,4	17,76	5,6	23,71	24,0	28,91	9,4	33,897	7,9
6,331		18,18	3,2	24,33	20,7	29,41	7,7	34,628	2,8
8,687	100,	18,91	16,6	25,43	9,1	30,26	4,6	34,999	3,3
12,264		19,52	9,5	25,76	34,3	31,56	3,9	35,432	6,1
12,890	2,2	20,28	2,5	26,94	4,1	32,08	3,4	36,006	4,3
13,445	1,4	20-	2,9	27,34	7,0	32,63	5,3	37,361	3,4
14,140	3,4	21,87	13,6	28,16	5,7	32,92	4,4	38,224	4,8
16,083	4,0								

Tabulka 2

Hemicitrát vytvořený ze sloučeniny vzorce I je charakteristický tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při úhlech difrakce asi

2-theta, [% relativní intenzity]: 4,306 [79,9], 16,317 [100,0], 20,988 [32,7], 21,476 [30,9], 22,643 [48,7], 23,384 [76,9], 24,891 [76,0], 27,573 [47,9] a 27,840 [32,3]. Hemicitrát vyrobený podle předloženého vynálezu poskytuje práškové rentgenové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je práškové rentgenové difrakční spektrum na Obr. 3.

Charakteristické 2-theta (2 θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum hemicitrátu sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 3.

2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)	2 θ	RI (%)
3,201	14,3	13,76	12,4	18,69	15,8	24,21	28,8	29,63	17,4
4,306	79,9	14,08	7,0	19,34	23,4	24,89	76,0	31,25	14,6
6,429	7,0	14,71	9,5	20,39	16,4	25,32	20,4	31,84	14,2
8,620	6,0	15,29	16,0	20,98	32,7	25,94	28,0	32,23	11,8
9,589	5,6	16,31	100,0	21,47	30,9	26,37	25,7	34,14	11,0
10,58	6,8	17,30	14,4	21,99	27,3	27,57	47,9	35,87	16,2
11,44	20,9	17,57	16,5	22,64	48,7	27,84	32,3	37,33	12,3
12,30	8,7	18,25	13,7	23,38	76,9	28,60	19,6		

Tabulka 3

Acetát vytvořený ze sloučeniny vzorce I je charakteristický tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při úhlech difrakce asi 2-theta, [% relativní intenzity]: : 6,096 [21,7]; 12,183 [21,4], 17,451 [33,3], 18,288 [100,0], 22,441 [57,7], 23,086 [19,9] a 24,439 [20,7]. Acetát vyrobený podle předloženého vynálezu poskytuje práškové rentgenové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je práškové rentgenové difrakční spektrum na Obr. 4.

Charakteristické 2-theta (2θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum acetátu sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 4

RI (%)	2θ	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)
21,7	6,096	16,79	4,5	21,346	8,9	27,93	5,8	32,27	4,1
2,8	8,625	17,12	12,8	22,441	57,7	28,82	10,0	33,12	5,1
2,9	11,84	17,45	33,3	23,086	19,9	29,64	6,1	35,03	3,4
21,4	12,18	17,92	8,7	24,038	7,5	30,63	3,3	36,44	3,2
4,2	14,83	18,28	100,0	24,439	20,7	31,11	3,2	37,83	3,0
9,2	15,26	20,08	3,6	24,760	11,3	31,95	2,9	39,47	2,5
5,0	15,82	20,45	11,3	25,861	5,0				

Tabulka 4

p-Tosylát vytvořený ze sloučeniny vzorce I je charakteristický tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při úhlech difrakce asi 2-theta, [% relativní intenzity]: 20,446 [100,0], 20,760 [74,0], 22,092 [81,7], 22,371 [70, 8], 23,190 [65,2], a 26,239 [61,5]. *p*-Tosylát vyrobený podle předloženého vynálezu poskytuje práškové rentgenové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je práškové rentgenové difrakční spektrum na Obr. 5.

Charakteristické 2-theta (2θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum *p*-tosylátu sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 5

	R1 (%)	2θ	R1 (%)	2θ	R1 (%)	2θ	R1 (%)	2θ	R1 (%)
7,515	28,0	14,337	18,3	18,97	40,4	24,11	30,5	29,67	19,6
7,822	22,3	15,001	22,2	19,73	36,7	25,47	40,2	31,03	19,3
11,15	15,0	15,601	21,4	20,44	100,0	25,93	50,4	31,58	21,2
12,20	24,5	16,297	14,0	20,76	74,0	26,23	61,5	35,35	19,6
6,817	50,3	13,373	53,9	18,17	21,3	23,19	65,2	28,16	34,5
12,80	30,0	16,943	32,0	22,09	81,7	27,35	48,8	36,80	16,4
13,04	43,6	17,362	23,5	22,37	70,8	27,83	39,0		

Tabulka 5

L-tartrát vytvořený ze sloučeniny vzorce I je charakteristický tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při úhlech difrakce asi 2-theta, [% relativní intenzity]: 4,061 [82,91,20,821 [85,6], 21,634 [100,0], 22, 179 [94,0], a 25,858 [95,1]. *L*-tartrát vyrobený podle předloženého vynálezu poskytuje práškové rentgenové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je práškové rentgenové difrakční spektrum na Obr. 6.

Charakteristické 2-theta (2θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum *L*-tartrátu sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 6.

2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)	2θ	RI (%)
4,061	82,9	14,63	27,2	20,01	53,0	24,78	53,8	32,46	36,1
6,678	11,8	15,42	22,7	20,33	58,7	25,08	60,9	33,44	33,7
8,057	29,4	16,14	31,2	20,82	85,6	25,85	95,1	34,09	34,6
9,383	8,7	16,85	65,3	21,63	100,0	26,80	59,6	34,64	26,8
10,647	8,3	17,33	56,2	22,17	94,0	28,38	34,3	35,63	33,7
11,711	60,2	18,40	97,0	22,73	73,8	29,06	34,1	36,07	28,5
12,075	27,4	18,63	98,2	23,47	77,1	29,84	30,5	36,77	24,5
12,868	33,8	18,99	52,4	24,25	67,8	31,30	39,4	38,08	22,6
13,320	22,7	19,72	42,9						

Tabulka 6

Bylo zjištěno, že krystaly anhydridu hemisukcinátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny mají hygroskopické vlastnosti za podmínek vlhkosti 90 %. Byly identifikovány dvě krystalické formy hemisukcinátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny. Bylo zjištěno, že krystalická forma A hemisukcinátu sloučeniny vzorce I má 0,6% hmotn. hygroskopičnost při 30 °C a 90% relativní vlhkosti. Krystalická forma B hemisukcinátu sloučeniny vzorce I má 1,5% hmotn. hygroskopičnost 30 °C a 90% relativní vlhkosti. Forma B hemisukcinátu se konvertuje na formu A hemisukcinátu v refluxu ethanolu za méně než 24 hodin. Hemisukcinátové soli forem A a B podle předloženého vynálezu poskytují prášková rentgenová difrakční spektra v podstatě shodná jako jsou prášková rentgenová difrakční spektra na Obr..7 a 8 v daném pořadí. Charakteristické 2-theta (2θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum hemicitrátu sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 3.

Hemisukcinátová sůl formy A sloučeniny vzorce I je charakterizována tím, že krystaly vykazují vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech 2-theta, [% relativní intenzity): 4,634 [100,0], 16,735 [67,2], 22,179 [60,8] a 25,002 [70,3].

Hemisukcinátová sůl formy B sloučeniny vzorce I je charakterizována tím, že krystaly vykazují vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech 2-theta, [% relativní intenzity): 6,714 [31,0], 15,272 [100,0], 19,197 [59,3], 19,457 [50,0], 24,487 [99,0] a 24,802 [79,1].

Charakteristické 2-theta (2 θ) hodnoty relativní intenzity (%) pro difrakční spektrum hemisukcinátové soli formy A a B sloučeniny obecného vzorce I je uvedeno v následujících Tabulkách 7 a 8 v tomto pořadí.

2 θ	Rl (%)	2 θ	Rl (%)	2 θ	Rl (%)	2 θ	Rl (%)	2 θ	Rl (%)
4,634	100,0	13,68	13,8	17,76	20,6	22,86	38,7	27,60	23,7
6,149	15,5	14,44	13,5	18,67	18,4	23,25	39,5	30,10	14,3
9,843	6,2	14,89	21,9	19,4	30,2	24,07	44,6	30,79	13,7
11,392	11,3	15,99	14,4	20,58	29,2	25,00	70,3	37,76	11,4
11,937	19,2	16,73	67,2	22,17	60,8	26,54	26,8		

Tabulka 7

2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)
6,714	31,0	15,27	100,	19,19	59,3	24,48	99,0	29,73	14,1
8,666	7,3	15,81	19,8	19,45	50,0	24,80	79,1	30,79	17,5
11,09	8,6	16,55	17,5	20,59	17,2	25,64	15,9	33,48	9,4
11,69	21,9	16,87	26,4	21,16	28,8	26,64	20,1	34,59	11,4
12,00	15,9	17,36	12,6	21,64	21,7	27,09	15,1	37,21	15,5
12,63	7,3	17,98	8,6	22,98	15,0	27,84	21,5	37,90	8,9
13,46	17,2	18,71	26,4	23,56	18,6	28,55	19,7	39,02	8,9
13,77	13,9								

Tabulka 8

Mesylátová sůl sloučeniny vzorce I je charakteristická tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při úhlech difrakce asi 2-theta, [% relativní intenzity]: 4,417 [99,3], 17,288 [45,5], 20,828 [39,6], 21,677 [43,5], 22,148 [68,3], 25,427 [100,0] a 27,006 [37,5]. Mesylátová sůl vyrobená podle předloženého vynálezu poskytuje práškové rentgenové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je práškové rentgenové difrakční spektrum na Obr.9.

Charakteristické 2-theta (2θ) hodnoty relativní intenzity (RI) v procentech pro difrakční spektrum mesylátové soli sloučeniny obecného vzorce I jsou uvedeny v Tabulce 9.

2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)	2θ	Rl (%)
4,417	99,3	15,619	9,1	21,67	43,5	27,00	37,5	32,337	9,0
8,806	7,2	17,288	45,5	22,14	68,3	28,75	8,8	32,940	7,8
11,664	7,0	17,654	17,2	23,23	14,1	29,56	6,7	33,796	11,8
12,267	18,7	17,993	15,9	23,96	28,8	30,56	6,2	34,550	8,7
12,610	8,3	18,728	9,8	24,60	30,2	31,17	9,7	35,308	7,6
13,224	5,4	20,358	15,0	25,42	100,0	31,72	13,3	36,883	9,1
14,915	27,1	20,828	39,6	26,22	16,1				

Tabulka 9

Rentgenový práškový difrakční vzor je pouze jeden z mnoha způsobů charakterizace uspořádání atomů, které jsou obsaženy v solích amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny. Další metody jsou známe ze stavu techniky, jako např. monochromatická rentgenová difrakce, může být použita pro identifikaci výše uvedených solí sloučeniny vzorce I.

Neočekávaně bylo zjištěno, že soli, kterými jsou acetát, hydrochlorid, hydrobromid, hemisukcinát a mesylát sloučeniny vzorce I mají vysokou krystalinitu, tj. jsou v podstatě bez amorfního materiálu. Takové soli mají výhodu, protože poskytují reprodukovatelnější výsledky při dávkování. Soli, kterými jsou hydrochlorid, hydrobromid a hemisukcinát sloučeniny vzorce I jsou v podstatě hygroskopicky stabilní, což snižuje potenciální problémy spojené se změnami hmotnosti aktivní složky během výroby tobolek nebo tablet. Hydrochlorid a hydrobromid sloučeniny vzorce I mají další výhodu, protože mají nízkou tendenci tvořit u koncentrovaných vodných roztoků viskózní směsi při stání. Dále hydrobromidová sůl sloučeniny vzorce I dodává mírné sedativní účinky při nízkém dávkování. Mesylátová sůl sloučeniny vzorce I má rychlou kinetickou rozpustnost ve vodě, což zjednodušuje dávkování s vodou a činí ji vhodnou pro injekční dávkovací formy. Dále, mesylátová sůl sloučeniny vzorce I se zvýšenými charakteristikami rozpustnosti usnadňuje rozpuštění pevných dávkových forem vhodným způsobem.

Soli *p*-Tosylát, *L*-tartrát a hemicitrát mají vyšší kinetickou rozpustnost, než volná báze nebo hydrochlorid

sloučeniny vzorce I. Navíc, soli *p*-tosylát, *L*-tartrát a hemicitrát sloučeniny vzorce I jsou méně hygroskopické než mesylátová sůl sloučeniny vzorce I. Proto, soli *p*-tosylát, *L*-tartrát a hemicitrát sloučeniny vzorce I jsou stabilnější na vzduchu a mohou být používány aniž by vlyhly.

Vynález se dále týká farmaceutické kompozice pro léčení hyperproliferativních poruch u savců, která obsahuje terapeuticky účinné množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu, farmaceuticky přijatelný nosič. V jednom provedení, uvedené farmaceutické kompozice jsou pro léčení nádorů, jako mozku, plic, dlaždicových buněk, močového měchýře, žaludku, slinivky, prsu, hlavy, krku, ledvin, prostaty, tlustého střeva, jícnu, nádorů gynekologických (jako vaječníku) nebo nádoru štítné žlázy. V dalším provedení, uvedená farmaceutická kompozice je pro léčení nenádorových hyperproliferativních poruch jako je benigní hyperplasie kůže (jako je psoriáza) nebo prostaty (např., benigní prostatická hypertrofie (BPH)).

Vynález se dále týká farmaceutické kompozice pro léčení nemocí slinivky nebo ledvin (včetně proliferativní glomerulonefritida a diabetem indukované nemoci ledvin) u savců, která obsahuje terapeuticky účinné množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu a farmaceuticky účinný nosič.

Vynález se rovněž týká farmaceutické kompozice pro prevenci implantace blastocytů u savců, která zahrnuje terapeuticky účinné množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu a farmaceuticky přijatelný nosič.

Vynález se rovněž týká farmaceutické kompozice pro léčení chorob spojených s vaskulogenezí nebo angiogenezí

savců, která obsahuje terapeuticky účinné množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu, a farmaceuticky přijatelný nosič. V jednom provedení, uvedená farmaceutická kompozice je pro léčení chorob vybraných ze skupiny, kterou tvoří angiogeneze tumoru, chronické zánětlivé nemoci, jako je revmatoidní arthritida, atheroskleróza, kožní nemoci jako je psoriáza, ekzém a skleroderma, diabetes, diabetická retinopatie, předčasná retinopatie, s věkem spojená makulární degenerace, hemangiom, gliom, melanom, Kaposiho sarkom a zhoubný nádor vaječníků, prsu, plic, pankreatu, prostaty, tlustého střeva a epidermální nádoru.

Vynález se také týká způsobu léčení hyperproliferativních poruch u savců, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu savcům. V jednom provedení se uvedená metoda týká léčení zhoubných nádorů jako nádoru mozku, plic, dlaždicových buněk, močového měchýře, žaludku, slinivky, prsu, hlavy, krku, ledvin, prostaty, kolorektální oblasti, jícnu, gynekologických (jako vaječníku) nebo nádoru štítné žlázy. V dalším provedení, se uvedený způsob týká léčení nenádorových hyperproliferativních poruch jako je benigní hyperplasie kůže (jako je psoriáza) nebo prostaty (např., benigní prostatická hypertrofie (BPH)). Vynález se dále týká způsobu léčení hyperproliferativních poruch u savců, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství soli sloučeniny nebo jejích solí savcům, v kombinaci s protinádorovým přípravkem vybraným z inhibitorů mitózy, alkylačních činidel anti-metabolitů, interkalačních antibiotik, inhibitorů růstového faktoru, inhibitorů buněčného cyklu, enzymů, inhibitorů topoisomerázy, modifikátory biologické odpovědi, anti-hormony, a anti-androgeny.

Předložený vynález se dále týká způsobu léčení nemocí slinivky břišní nebo ledvin u savců, které zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu savcům. Vynález se dále týká způsobu prevence implantace blastocytů u savců, které zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu savcům.

Předložený vynález se dále týká způsobu léčení nemocí, spojených s vaskulogenezí nebo angiogenezí, u savců, které zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství soli sloučeniny vzorce I nebo jejího hydrátu savcům. V jednom provedení, uvedený způsob je pro léčení nemocí vybraných ze skupiny, kterou tvoří angiogeneze tumoru, chronická zánětlivá nemoc, jako je revmatoidní artritida, atheroskleróza, kožní nemoci jako je psoriáza, ekzém a sklerodermie, diabetes, diabetická retinopatie, předčasná retinopatie, makulární degenerace, hemangiom, gliom, melanom, Kaposiho sarkoma a zhoubný nádor vaječníku, prsu, plic, pankreatu, prostaty, tlustého střeva a epidermoidní karcinom.

Dále sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být použity jako kontraceptivum u savců. V jednom výhodném provedení sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být použity pro léčení pro prevenci gravidity samic savců.

Pacienti, kteří mohou být léčení solemi sloučeniny vzorce I a hydráty těchto sloučenin, v souladu se způsoby podle předloženého vynálezu, například, pacientů, u kterých byla diagnostikována psoriáza, BPH, plicní nádor, kosti, rakovina, nádor slinivky břišní, kožní nádor, nádor hlavy a krku, kožní nebo intraokulární melanom, děložní nádor,

nádor vaječníku, rektální nádor nebo nádor anální oblasti, nádor žaludku, nádor tračníku, nádor prsu, gynekologické tumory (např., děložní sarkomy, karcinom vejcovodu, karcinom endometria, karcinom děložního hrdla, karcinom vaginy nebo vulvy), Hodgkinsova choroba, nádor jícnu, nádor tenkého střeva, nádor endokrinního systému (jako je nádor štítné žlázy, příštítného tělíska nebo nadledviny), sarkomy měkkých tkání, nádory močové trubice, nádor penisu a prostaty, chronická nebo akutní leukemie, pevné tumory u dětí, lymfatické lymfomy, zhoubné nádory měchýře, ledvin nebo močovodu (např., karcinom renálních buněk, karcinom ledvinové pánvičky) nebo neoplasma centrální nervové soustavy (např., primární CNS lymfom, tumory spinální osy, gliomy mozkového kmene nebo adenomy hypofýzy).

Předložený vynález se rovněž týká farmaceutických kompozic pro léčení infekce u savců, včetně člověka, které je usnadněno farnesyl proteintransferázou, jako je malárie delta virová hepatitida, zahrnující množství soli sloučenin vzorce I, jak jsou výše definovány a jejich proléčiva nebo solváty, které je účinné při léčení abnormálního buněčného růstu a farmaceuticky přijatelný nosič.

"Abnormální buněčný růst", jak je zde používán bez další indikace, znamená buněčný růst, který je nezávislý na normálních regulačních mechanismech (například, ztráta kontaktní inhibice). Zahrnuje abnormální růst: (1) tumorových buněk (tumory) exprimující aktivovaný Ras onkogen; (2) tumorové buňky, ve kterých Ras protein je aktivován jako výsledek onkogenní mutace v jiném genu; (3) benigní a maligní buňky dalších proliferativních chorob u kterých se vyskytuje aberantní aktivace Ras; a

(4) tumory, které proliferují účinkem vlastností farnesylproteíntransferázy.

Termín "léčení", jak je zde používán, bez další indikace, znamená zvrácení, zmírnění, potlačení rozvoje, nebo prevenci chorob nebo stavů pro které je tento termín používán, nebo jeden nebo více symptomů takové poruchy nebo stavu. Termín "léčení", jak je zde používán, bez další indikace, znamená léčení, jak je zde bezprostředně výše „léčení“ definováno.

Detailní popis vynálezu

Předložený vynález se týká solí, kterými jsou hydrochlorid, hydrobromid, hemicitrát, acetát, *p*-tosylát, *L*-tartrát, hemisukcinát a mesylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)-ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

Vynález se dále týká způsobu výroby solí, kterými jsou hydrochlorid, hydrobromid, hemicitrát, acetát, *p*-tosylát, *L*-tartrát, hemisukcinát, a mesylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)-ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny. Soli, které jsou předmětem vynálezu jsou užitečné při léčení hyperproliferativních chorob, jako je rakovina u savců, zejména lidí a pro farmaceutické kompozice obsahující tyto sloučeniny.

Soli sloučeniny vzorce I byly charakterizovány s použitím rentgenové práškové difraktoimetrie. Hydrochlorid, hydrobromid, hemicitrát, acetát, *p*-tosylát,

L-tartrát, hemisukcinát (forma A), hemisukcinát (forma B) a mesylát sloučeniny vzorce I I vykazují rentgenové práškové difrakční vzory v podstatě shodné jak jsou znázorněny na Obr.S 1-9.

Hydrochlorid amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 8,623, 12,121, 17,298, 23,397, 23,944, 24,119, 24,873, 25,948 a 28,821.

Hydrobromid amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 8,687, 12,264, 17,374, 23,711, 24,335 a 25,769.

Hemicitrát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 4.306, 16,317, 20,988, 21,476, 22,643, 23,384, 24,891, 27,573 a 27,840.

Acetát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)-ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních

píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 06,096, 12,183, 17,451, 18,288, 22,441, 23,086 a 24.439.

p-Tosylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 20,446, 20,760, 22,092, 22,371, 23,190 a 26,239.

L-Tartrát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 4,061, 20,821, 21,634, 22,179 a 25,858.

Hemisukcinát (forma A) amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 4,634, 16,735, 22,179 a 25,002. Forma A hemisukcinátu absorbuje 0,6 % vody při 90% relativní vlhkosti.

Hemisukcinát (forma B) amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje

vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 6,714, 15,272, 19,197, 19,457, 24,487 a 24,802. Forma B hemisukcinátu absorbuje 1,5 % vody při 90% relativní vlhkosti.

Mesylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny podle předloženého vynálezu je charakterizován tím, že krystal poskytuje vysokou intenzitu difrakčních píků při difrakčních úhlech (2θ) v rentgenovém práškovém difrakčním spektru asi 4,417, 17,288, 20,828, 21,677, 22,148, 25,427 a 27.006.

Aktivita sloučenin vzorce I *in vitro* při inhibici KDR/VEGF receptoru může být stanovena následujícím postupem.

Schopnost sloučenin podle předloženého vynálezu inhibovat aktivitu tyrosin kinázy je možno stanovit s použitím rekombinantního enzymu způsobem při kterém se měří schopnosti sloučenin inhibovat fosforylaci exogenního substrátu, polyGluTyr (PGT, Sigma™, 4: 1). Kinázová doména lidského KDR/VEGF receptoru (aminokyseliny 805-1350) se exprimuje Sf9 jako glutathion S-transferáza (GST)-fúzní protein s použitím baculovirového expresního systému. Protein se pak získá přečištěním z lyzátů těchto buněk s použitím glutathion-agarózových afinitních kolon. Enzymový test se provádí na destičkách o 96 jamkách, které jsou potaženy PGT substrátem (0,625 µg PGT na jamku). Testované sloučeniny jsou zředěny dimethylsulfoxidem (DMSO) a potom naneseny PGT destičky tak, aby konečná koncentrace DMSO při

stanovení byla 1,6 % obj.. Rekombinantní enzym je zředěn ve fosforylačním pufru (50 mM Hepes, pH 7,3, 125 mM NaCl, 24 mM MgCl₂). Reakce je iniciována přidáním ATP na konečnou koncentraci 10 M. Po 30 minutách inkubace při teplotě místnosti za třepání, reakce se odsaje, a destičky se promyjí puftrem (PBS-obsahující 0,1% Tween-20). Množství fosforylovaného PGT se kvantifikuje inkubací s HRP (HRP je křenová peroxydáza)-konjugovanou s PY-54 protilátkou (Transduction Labs), detekce se provede s TMB peroxidázou (TMB je 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) a reakce se kvantitativně vyhodnotí na BioRad Microplát Reader, při 450 nm. Inhibice enzymatické aktivity kinázy testovanou sloučeninou se detekuje jako snížení absorbance, a koncentrace sloučeniny potřebná pro 50% snížení signálu se označuje jako IC₅₀ hodnota testované sloučeniny.

Pro měření schopnosti sloučenin inhibovat aktivitu KDR tyrosinkinázy v celé délce proteinu, který existuje v buňkách, mohou být použity prasečí aortální endotheliální (PAE) buňky transfektované lidským KDR (Waltenberger et al., J.Biol. Chem. 269: 26988, 1994). Buňky se nanesou a nechají se přichítit na destičkách o 96 jamkách ve stejném médiu (Ham's F12) s 10 % obj. FBS (fetální hovězí serum). Buňky se potom promyjí, obnoví se médium bez séra, ale obsahující (0,1 % obj. FBS), které obsahuje 0,1 % obj. hovězího sérového albuminu (BSA) a buňky se inkubují po dobu 16-24 hodin. Bezprostředně před přidáním testované sloučeniny, byly buňky znovu vyživovány médiem bez séra, (0,1 % obj. FBS) (bez BSA). Testované sloučeniny rozpuštěné v DMSO se naředí v médiu (konečná koncentrace DMSO 0,5 % obj.). Po 2 hodinách inkubace se přidá k reakčnímu médiu, VEGF165 (50 ng/ml konečná koncentrace) na 8 minutovou inkubaci. Buňky se promyjí a zlyzují se v 50 μ lyzujícím

pufu obsahujícím 20 mM Tris-HCL (pH 8), 150 M NaCl, 1 % obj.v NP40, 2 mM NaVO₄, 500 µM EDTA, 1 mM PMSF a 1 tableta/25 ml DTA zbavený kompletní @Protease Inhibitor Table, Roche. Buněčný lyzát se potom zředí na konečný objem 150 µl v PBS/1 mM NaVO₄. Rozsah fosforylace vyvolaný KDR se stanoví s použitím ELISA testu. Kozí anti-králičí protilátkou potažená destička (Pierce) se blokuje pufrem Superblock (Pierce) před přidáním protilátky anti-flk-1 C-20 (0,5 µg na jamku, Santa Cruz). Nenavázaná protilátka se vymyje z destičky před přidáním 100 µl buněčného lyzátu. Po 2 hodinách inkubace lyzátu s protilátkou flk-1, se KDR spojený s fosfotyrosinem kvantifikuje vyvinutím s HRP konjugovanou s protilátkou PY-54 a TMB, jak je popsáno výše. Schopnost sloučenin inhibovat autofosforylaci stimulovanou VEGF o 50 %, vzhledem k VEGF-stimulované u kontrolního vzorku se označuje jako IC₅₀ hodnota pro testované sloučeniny.

Schopnost sloučenin inhibovat mitózu lidských endotheliálních buněk se hodnotí jejich schopností inhibovat inkorporaci ³H-thymidinu do HUVE buněk (endotheliální buňky lidské pupeční šňůry, CloneticsTM). Toto stanovení je v literatuře dobře popsáno (Waltenberger J et al. J.Biol. Chem. 269: 26988, 1994; Cao Y et al. J.Biol. Chem. 271: 3154, 1996). Stručně, 10⁴ buněk se nanese na 24 jamkové destičky potažené kolagenem a nechá se přichytit. Pak se k buňkám přidá médium prosté séra a po 24 hodinách se ošetří různými koncentracemi sloučeniny (roztok připravený v DMSO, konečná koncentrace DMSO při stanovení je 0,2 % obj.) a 2-30 ng/ml VEGF₁₆₅. Během posledních 3 hodin z 24 hodinového působení, se buňky promyjí ³H thymidinem (NEN, 1 µCi na jamku). Medium se odstraní a buňky se properou extenzivně ledově chladným Hanksovým vyváženým

solným roztokem a potom 2 krát ledově chladnou kyselinou trichloroctovou (10 % obj.). Buňky se lyzují přidáním 0,2 ml 0,1 N NaOH a lyzát se převede do scintilačních nádobek. Jamky se potom promyjí 0,2 ml 0,1 N HCl, a promývací roztoky se rovněž převedou do lahvíček. Rozsah inkorporace ^3H thymidinu se stanoví na scintilačním detektoru. Schopnost sloučenin inhibovat inkorporaci o 50 %, vzhledem ke kontrolnímu vzorku (VEGF zpracovaný pouze s DMSO nosičem) se označuje jako IC_{50} hodnoty pro testované sloučeniny.

Aktivita sloučenin vzorce I 1 *in vivo*, může být stanovena velikostí inhibice růstu tumoru testovanou sloučeninou vzhledem ke kontrolnímu pokusu. Inhibiční účinek růstu tumoru různých sloučenin se stanoví metodami podle Corbett T. H., a spol. "Tumor Induction Relationships in Development of Transplantable Cancers of the Colon in Mice for Chemotherapy Assays, with a Note on Carcinogen Structure", Cancer Res., 35, 2434-2439 (1975) a Corbett, T. H., et al., "A Mouse Colon-tumor Model for Experimental Therapy", Cancer Chemother. Rep. (Part 2)", 5, 169-186 (1975), s malými modifikacemi. Tumory se indukují v levém boku injekcí 1×10^6 kultivovaných tumorových buněk v logaritmické fázi (lidská MDA MB-468 prs nebo lidských buněk nádoru hlavy nebo krku HN5) suspendovaných v 0,10 ml RPMI 1640. Po dostatečné době, kdy se tumory u testovaných zvířat stanou hmatatelné (2-3 mm v průměru), testovaná zvířata (athymická myš) jsou ošetřena aktivní sloučeninou (ve formě roztoku v DMSO typicky při koncentraci 50 až 100 mg/mL následně zředěného 1: 9 solankou nebo alternativně, 1: 9 zředěného 0,1% PluronicT P105 v 0,9% solance) intraperitoneálním (ip) nebo orálním (po) způsobem podání dvakrát denně (tj., každých 12 hodin) po 5 po sobě jdoucích

dní. Pro vyhodnocení anti-tumorových účinků, se tumor měří v milimetrech pomocí Vernierova měřítka dva příčné rozměry a velikost tumoru (mg) se vypočte s použitím vzorce :

$$\text{Hmotnost tumoru} = (\text{délka} \times [\text{šířka}]^2) / 2, \text{ podle metody Geran R.I., et al. "Protocols for Screening Chemical Agents a Natural Products Against Animal Tumors a Other Biological Systems", Third Edition, Cancer Chemother. Rep., 3,1-104(1972).}$$

Výsledky se vyjadřují jako % inhibice, podle vzorce : $\text{Inhibice (\%)} = (\text{TuW}_{\text{kontrol}} - \text{TuW}_{\text{test}}) / \text{TuW}_{\text{kontrol}} \times 100\%$. Implantace tumoru do slabin poskytuje reprodukovatelné výsledky dávkování/odezva účinku pro různá chemoterapeutika a způsob měření (průměr tumoru) je spolehlivý způsob hodnocení rychlosti růstu tumorů.

Podávání sloučenin podle předloženého vynálezu (dále "aktivní sloučenina nebo sloučeniny") je možno provádět všemi způsoby, které umožňují transport uvedených sloučenin na místo působení. Tyto způsoby zahrnují orální způsoby podání, intraduodenální způsoby, parenterální injekce (včetně injekce intravenózní, subkutánní, intramuskulární, intravaskulární nebo infuzní), topikální a rektální podávání.

Množství podané aktivní sloučeniny závisí na subjektu léčby, závažnosti choroby nebo stavu, rychlosti podávání a posouzení ošetřujícím lékařem. Nicméně, účinná dávka bývá v rozsahu asi 0,001 až asi 100 mg na kg tělesné hmotnosti na den, výhodně asi 1 až asi 35 mg/kg/den, v jedné nebo v rozdělené dávce. Pro člověka o hmotnosti 70 kg, činí tato dávka asi 0,05 až asi 7 g/den, výhodně asi 0,2 až asi 2,5 g/den. V některých případech mohou být vhodnější dávky pod výše uvedeným rozmezím dávek, zatímco v jiných případech je možné aplikovat dávky ještě vyšší, aniž by vyvolaly

škodlivý účinek s tou výhradou, že uvedené vyšší dávky se nejprve rozdělí do několika menších dávek, které se podávají v průběhu dne.

Aktivní sloučenina může být aplikována jako samostatná terapie nebo ji lze aplikovat v terapii s jedním nebo více protinádorovými prostředky, například prostředky vybranými ze skupiny zahrnující, inhibitory mitózy, například vinblastin; alkylační činidla, například cis-platina, karboplatina a cyklofosfamid; anti-metabolity, například 5-fluorouracil, cytosin arabinosid a hydroxymočovina nebo například jedno z výhodných anti-metabolik uvedených v Evropské patentové přihlášce č. 239362 jako je kyselina N-(5-(3,4-dihydro-2-methyl-4-oxochinazolin-6-ylmethyl)-N-methylamino]-2-thenoyl)-L-glutamová; inhibitory růstového faktoru; inhibitory buněčného cyklu; antibiotika s interkalačním mechanismem, například adriamycin a bleomycin; enzymy, například interferon; a anti-hormony, například anti-estrogeny jako je NolvadexTM (tamoxifen) nebo například anti-androgeny jako Casodex (4'-kyano-3-(4-fluorfenylsulfonyl)-2-hydroxy-2-methyl-3'-(trifluoromethyl) propionanilid). Uvedenou kombinovanou léčbu je možné provádět současným, následným nebo samostatným podáváním jednotlivých terapeutických složek.

Farmaceutická kompozice může být například ve formě vhodné pro orální podávání jako jsou tablety, tobolky, pilulky, prášek, přípravky s řízeným uvolňováním, roztok, suspenze, pro parenterální injekce jako sterilní roztok, suspenze nebo emulze, pro topikální podávání, jako masti nebo krémy nebo pro rektální podávání jako čípky. Farmaceutická kompozice může být v jednotkové dávkové formě vhodné pro jednotlivé podávání přesných dávek.

Farmaceutická kompozice obsahuje běžný farmaceutický nosič nebo excipient a sloučeninu podle vynálezu jako aktivní složku. Dále může zahrnovat další léčivý nebo farmaceutický prostředek, nosiče, adjuvans, atd..

Příklady forem pro parenterální podávání zahrnují roztoky nebo suspenze aktivních sloučenin ve sterilních vodných roztocích, například vodný roztok propylenglykolu nebo dextrózy. Uvedené dávkovací formy mohou obsahovat tlumiče je-li to zapotřebí.

Vhodné farmaceutické nosiče zahrnují inertní ředidla nebo plniva, vodu a různá organická rozpouštědla. Farmaceutické kompozice mohou, je-li to žádoucí, obsahovat další složky jako ochucovadla, pojiva, excipienty a podobně. Pro orální podávání je možno použít tablety, obsahující různé excipienty, jako je kyselina citrónová společně s prostředky proti rozpadání, jako je škrob, kyselina alginová a některé komplexní silikáty a s pojivy jako je sacharóza, želatina a arabská klovatina. Dále, lubrikační činidla jako stearát hořečnatý, laurylsíran sodný a talek jsou často užitečné pro účely tabletizace. Pevné kompozice podobného typu je možno použít pro plnění měkkých a tvrdých želatinových tobolek. Mezi výhodné složky patří laktóza nebo mléčný cukr polyethylenglykoly o vysoké molekulové hmotnosti. Pokud je zapotřebí připravit vodné suspenze nebo elixíry pro orální podávání aktivní sloučenina může být kombinována s různými sladidly nebo ochucovadly, barvivíci prostředky nebo barvivy a jestliže je to žádoucí, emulgační činidla nebo suspendační činidla, společně s ředidly jako voda, ethanol, propylenglykol, glycerin nebo jejich kombinace.

Způsoby přípravy různých farmaceutických kompozic se specifikovaným množstvím aktivní sloučeniny jsou známe nebo nebo snadno dostupné odborníkům v oboru. Například, viz Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 15th Edition (1975).

Příklady přípravy uvedené níže dále ilustrují doložené příklady sloučenin podle předloženého vynálezu a způsoby přípravy těchto sloučenin. Náledující příklady a přípravy však žádným způsobem neovlivňují rozsah předloženého vynálezu.

Spektra na Obr. 1-9 byla zaznamenána s použitím Siemens 6/26 práškového difraktometru vybaveného následujícím způsobem: čtyřicetipolohový automatický vzorkovač, goniometr s pevnými štěrbinami, uzavřená-měděná trubice (Cu) zdroj rentgenového záření (vlnová délka 1: 1,54056, vlnová délka 2: 1,54439), a Kevex pevný detektor stavu. Trubicový zdroj: 40-mA x 50-kV nebo jak je vhodné. Štěrby: 1 x 1 x 0,6 mm (zdroj, usměrňovač a štěrby detektoru, v daném pořadí). Velikost kroku: 0,04 stupňů ve 2 θ . Doba na jeden krok: 1 sekunda. Start skenování: 3 stupně ve 2 θ . Konec skenování: 40 stupňů ve 2 θ .

Příklady provedeníPříklad 1

Volná báze 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

Volná báze 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny se připraví postupem popsaným v Příkladu 30 US patentu 09/316837, podaném 21. 5.1999, jehož odhalení jsou zde začleněna odkazem jako celek. Teplota tání 208 °C (DSC). Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intenzity]): 9,314 [100,0], 11,356 [44,8], 15,897 [49,6], 22,059 [84,5], 22,520 [63,3], 22,726 [70,0], 23,927 [67,61], 24,307 [60,51], 25,310 [64,8] a 26,551 [86,6].

Příklad 2

Hydrochlorid amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

Amid 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny (500 mg, 0,939 mmol) byl rozpuštěn v EtOH (20 ml) při refluxu, roztok se nechal ochladit na teplotu prostředí a byl zpracován s HCl (0,94 ml 1,0 M roztoku v Et₂O) s kroužením baňkou. Směs byla potom jemně třepána při zahřívání na 50 °C po dobu 3 hodin a při teplotě prostředí

3 dny. Pevný podíl byl odfiltrován, vysušen za vysokého vakua do získání bílé pevné látky (468 mg, 0,823 mmol, 82 %). Teplota tání 230 °C (DSC). Hygroskopičnost: 1 % (hmotn.) při 90% relativní vlhkosti a teplotě prostředí (RH). Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intenzity]): 8,623 [90,7], 12,121 [38,9], 17,298 [95,2], 23,397 [44,71], 23,944 [51,7], 24,119 [62,7], 24, 873 [55,7], 25,948 [100] a 28,821 [39,6].

Příklad 3

Hydrobromid amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

Bromovodíková kyselina (1,0 mL 47-49% vodný 8,9M roztok) byl přidán ke 4 mL MeOH a poto naplněn po 8,9 mL značku válce se stupnicí MeOH. Odděleně 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]-isothiazol-4-karboxylová kyselina (500 mg, 0,939 mmol) byla rozpuštěna v CH₂Cl₂ (10 ml) a MeOH (4 ml) a byla přidána HBr (1,0 ml roztoku popsaného výše). Tento roztok byl potom umístěn do difuzní komory obklopené Et₂O. Po 16 hodinách, se objevila pevná látka. Et₂O byl nahrazen čerstvým Et₂O a difuze pokračovala přes noc. Byla získána bílá pevná látka (529 mg, 0,863 mmol, 86 %). Teplota tání 201,0 °C (DSC). Hygroskopičnost: 0,1 % při 87% relativní vlhkosti.. Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intenzita]) : 8,687 [100,0], 12,264 [35,9], 17,374 [42,3], 23,711 [24,0], 24,335 [20,7] a 25,769 [34,3].

Příklad 4

Hemicitrát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylová kyselina (532 mg, 1,00mmol), kyselina citrónová (96 mg, 0,50 mmol), a MeOH (8 ml) byly spojeny v 16 mL baňce septem a zahřívána, při třepání, na 75 °C po dobu 24 hodin. Směs byla ochlazena na teplotu prostředí a filtrována. Pevná látka byla proprána MeOH a vysušena proděním vzduchu přes pevnou látku. Byla získána bílá pevná látka (530 mg, 0,843 mmol, 84 %). Teplota tání 201,7 °C (DSC). Hygroskopičnost: 0,43 % při 87% relativní vlhkosti. Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intenzity]): 4,306 [79,9], 16,317 [100,0], 20,988 [32,7], 21,476 [30,9], 22,643 [48,7], 23,384 [76,9], 24,891 [76,0], 27,573 [47,9] a 27,840 [32,3].

Příklad 5

Acetát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylová kyselina (532 mg, 1.00 mmol), octová kyselina (57 µl, 1,0 mmol) a MeOH (3 mL) byly spojeny v 8 mL baňce uzavřené septem a zahřívány při

třepání, při 75 °C po dobu 24 hodin. Směs byla ochlazena na teplotu prostředí a umístěna do komory s Et₂O. Po pěti hodinách byly získány velké krystaly dekantováním kapaliny a propráním pevné látky MeOH a potom Et₂O. Pevná látka byla vysušena krátkým prouděním vzduchu přes pevnou látku. Byla získána bílá pevná látka (330 mg, 0,557 mmol, 56 %). Teplota tání 175 °C (DSC). Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intenzity]): 6,096 [21,7], 12,183 [21,4], 17,451 [33, 3], 18,288 [100,0], 22,441 [57,7], 23,086 [19, 9] a 24,439 [20,7].

Příklad 6

p-Tosylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylová kyselina (532 mg, 1,00 mmol), monohydrát p-toluensulfonové kyseliny (179 mg, 1,00 mmol), MeOH (10 ml), a CH₂Cl₂ (1 ml) byly spojeny filtrovány pro odstranění malého množství velmi jemných částic a proprány dalším CH₂Cl₂ (3 ml). Roztok byl přidán k dalšímu CH₂Cl₂ (4 ml) plus MeOH (1 mL) a umístěn v difúzní komoře s Et₂O přes noc. Nevytvořily se žádné krystaly, proto byl Et₂O nahrazen pentanem přes noc. Pevná látka byla proprána Et₂O a vysušena vzduchem proudícím přes pevnou látku. Byla získána bílá pevná látka (572 mg, 0,812 mmol, 81 %). Teplota tání 140 a 174 °C (DSC). Hygroskopičnost: -0,9 % při 87% relativní vlhkosti. Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky

(2-theta, [% relativní intenzity]): 20,446 [100,0], 20,760 [74,0], 22,092 [81,7], 22,371 [70,8], 23,190 [65,2], 26,239 [61,5].

Příklad 7

L-tartrát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylová kyselina (532 mg, 1.00 mmol), L-vinná kyselina (150 mg, 1,00 mmol) a MeOH (8 ml) byly spojeny v 16 ml baňce uzavřené septem a zahřívány při míchání, na 75 °C po dobu 24 hodin. Směs byla ochlazena na teplotu prostředí a filtrována. Pevná látka byla proprána MeOH a vysušena prouděním vzduchu přes pevnou látku. Byla získána bílá pevná látka (617 mg, 0,904 mmol, 90 %) Teplota tání 206 °C (DSC). Hygroskopičnost: 0,3 % při 100% relativní vlhkosti. Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intenzity]): 4,061 [82,9], 20,821 [85,6], 21,634 [100,0], 22,179 [94, 0], 25,858 [95,1].

Příklad 8

Hemisukcinát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny (Forma A)

3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-

-ylbutyl)ureido]-isothiazol-4-karboxylová kyselina (532 mg, 1,00 mmol), sukcinová kyselina (59 mg, 0,50 mmol) a MeOH (8 ml) byly spojeny v 16 mL baňce uzavřené septem a zahřívány, při třepání, na 75 °C po dobu 24 hodin. Směs byla ochlazena na teplotu prostředí a filtrována. Pevná látka byla proprána MeOH a vysušena prouděním vzduchu přes pevnou látku byla získána bílá pevná látka (500 mg, 0,845mmol, 85 %). Teplota tání Forma A 216 °C (DSC). Hygroskopičnost: 0,6 % při 90% relativní vlhkosti. Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intensita]): Forma A: 4,634 [100,0], 16,735 [67,2], 22,179 [60,8], a 25,002 [70,3].

Příklad 9

Hemi-sukcinát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny (Forma B)

3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]-isothiazol-4-karboxylová kyselina (100 mg) byla rozpuštěna při zahřívání v 6 ml EtOH:MeOH (2:1) sukcinová kyselina (11.1 mg, 0,5 ekv.) rozpuštěná v EtOH byla přidána k dřívějšímu roztoku. Směs byla ochlazena na teplotu prostředí míchána 20 min. a filtrována. Pevná látka byla proprána EtOH a vysušena prouděním vzduchu přes pevnou látku. byla získána bílá pevná látka ((80 mg, 70%)). Hygroskopičnost: Forma B: 1,5 % při 90% relativní vlhkosti. Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intensita]): 6,714 [31,0], 15,272 [100,0], 19,197 [59,3], 19,457 [50,0], 24,487 [99,0] a 24,802 [79,1].

Příklad 10

Mesylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-ylbutyl)ureido]isothiazol-4-karboxylová kyselina (10,9 g, 20,5 mmol) byla rozpuštěna v MeOH (150 ml) a ochlazena na 0 °C. V oddělené baňce, byl přidán $\text{H}_3\text{CSO}_3\text{H}$ (1,33 ml) k MeOH (15 ml) při 0 °C. Roztok kyseliny byl přidán po kapkách během 10 minut k roztoku výchozího aminu. Roztok byl zahřát na teplotu prostředí, filtrován k odstranění minoritních pevných nečistot, zředěn Et_2O (1 l) a míchán po dobu 1 h. Směs byla dále zředěna hexanem (500 ml) a ochlazena na 0 °C s pokračujícím mícháním. Potom se nechal stát při 0 °C přes noc, krystaly byly odfiltrovány, proprány hexanem, a vysušeny sáním k získání bílé pevné látky (11,1 g, 17,7 mmol, 86 %). Charakteristické rentgenové práškové difrakční píky (2-theta, [% relativní intenzity]): 4,417 [99,3], 17,288 [45,5], 20,828 [39,6], 21,677 [43,5], 22,148 [68,3], 25,427 [100,0] a 27,006 [37,5].

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Hydrobromid amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

2. Sůl podle nároku 1, kde tato sůl má rentgenové práškové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je rentgenové práškové difrakční spektrum na Obr. 2.

3. Hemicitrát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

4. Sůl podle nároku 3, kde tato sůl má rentgenové práškové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je rentgenové práškové difrakční spektrum na Obr. 3.

5. Acetát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

6. Sůl podle nároku 5, kde tato sůl má rentgenové práškové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je rentgenové práškové difrakční spektrum na Obr. 4.

7. p-Tosylát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

8. Sůl podle nároku 7, kde tato sůl má rentgenové práškové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je rentgenové práškové difrakční spektrum na Obr. 5.

9. *L*-Tartrát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny

10. Sůl podle nároku 9, kde tato sůl má rentgenové práškové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je rentgenové práškové difrakční spektrum na Obr. 6.

11. Hemisukcinát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]-isothiazole-4-karboxylové kyseliny, forma A.

12. Sůl podle nároku 11, kde tato sůl má rentgenové práškové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je rentgenové práškové difrakční spektrum na Obr. 7.

13. Hemisukcinát amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]-isothiazol-4-karboxylové kyseliny, forma B.

14. Sůl podle nároku 13, kde tato sůl má rentgenové práškové difrakční spektrum v podstatě shodné jako je rentgenové práškové difrakční spektrum na Obr. 8.

15. Použití sloučenin podle nároků 1, 3, 5, 7, 9, 11 nebo 13 pro výrobu léčiva pro léčení hyperproliferativních poruch u savců.

16. Použití podle nároku 15, kde léčivo se používá pro léčení nádorů vybraných z nádorů mozku, dlaždicových buněk, měchýře, žaludku, pankreatu, prsu, hlavy, krku, jícnu,

prostaty, tlustého střeva, plic, ledvin, vaječníků, gynekologických nádorů a nádorů štítné žlázy.

17. Farmaceutická kompozice, vyznačující se tím, že zahrnuje množství sloučeniny podle nároků 1, 3, 5, 7, 9, 11 nebo 13 účinné pro léčení hyperproliferativních poruch u savců a farmaceuticky účinný nosič.

18. Farmaceutická kompozice podle nároku 17, vyznačující se tím, že hyperproliferativní poruchou je nádor vybraný z nádoru mozku, plic, dlaždicových buněk, měchýře, žaludku, pankreatu, prsu, hlavy, krku, ledvin, vaječníku, prostaty, tlustého střeva, jícnu, gynekologických nádorů a nádorů štítné žlázy.

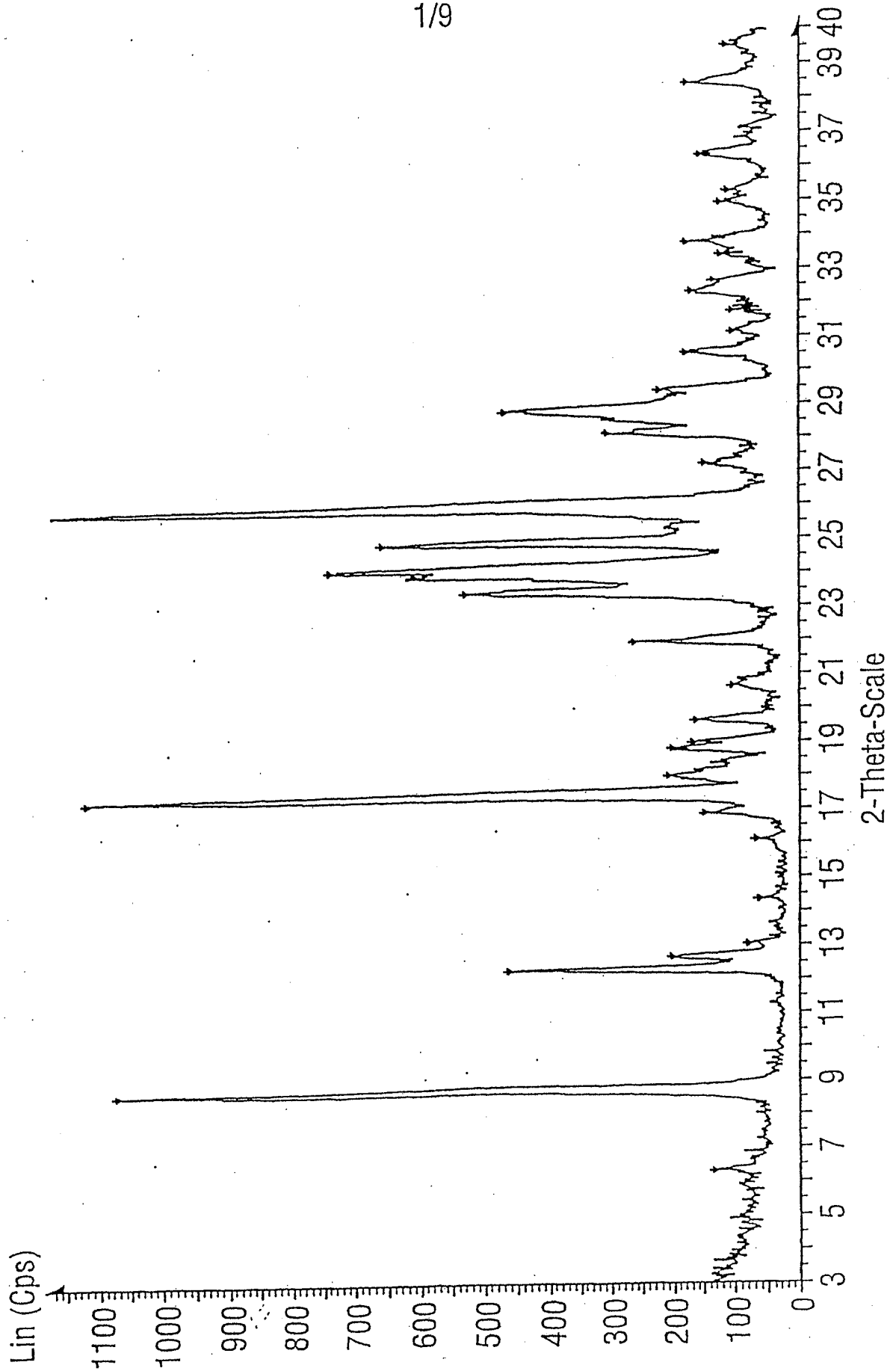
19. Způsob přípravy hydrobromidu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)-ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny, vyznačující se tím, že zahrnuje reakci bromovodíku s amidem 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]-isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

20. Způsob přípravy hemicitrátu amidu 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)-ureido]isothiazol-4-karboxylové kyseliny vyznačující se tím, že zahrnuje reakci amidu kyseliny citrónové 3-(4-brom-2,6-difluorbenzyloxy)-5-[3-(4-pyrrolidin-1-yl-butyl)ureido]-isothiazol-4-karboxylové kyseliny.

23.01.04

PV 2003-1315

1/9



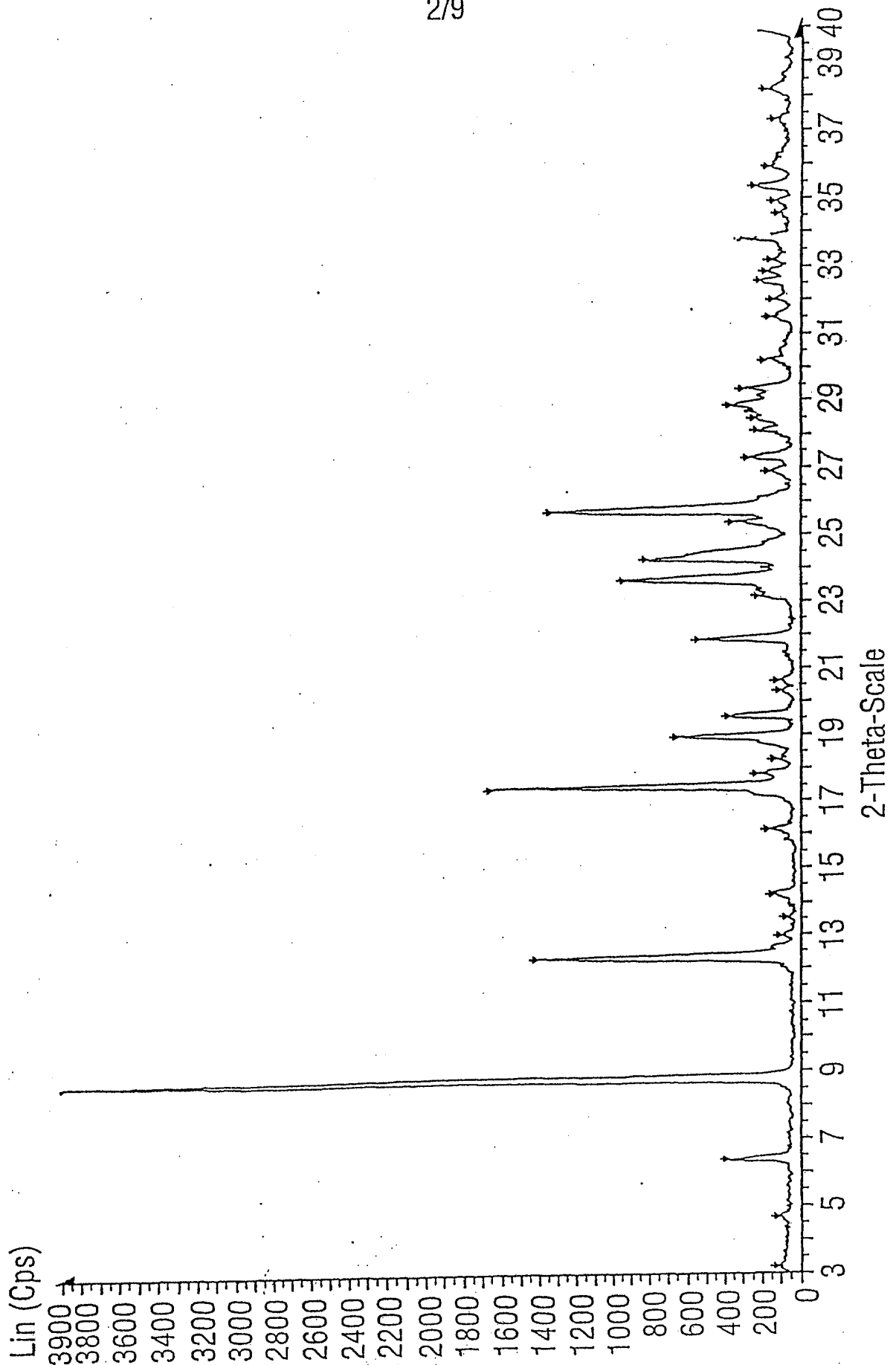
Mem.

Obr. 1

230104

PR 2003-1315

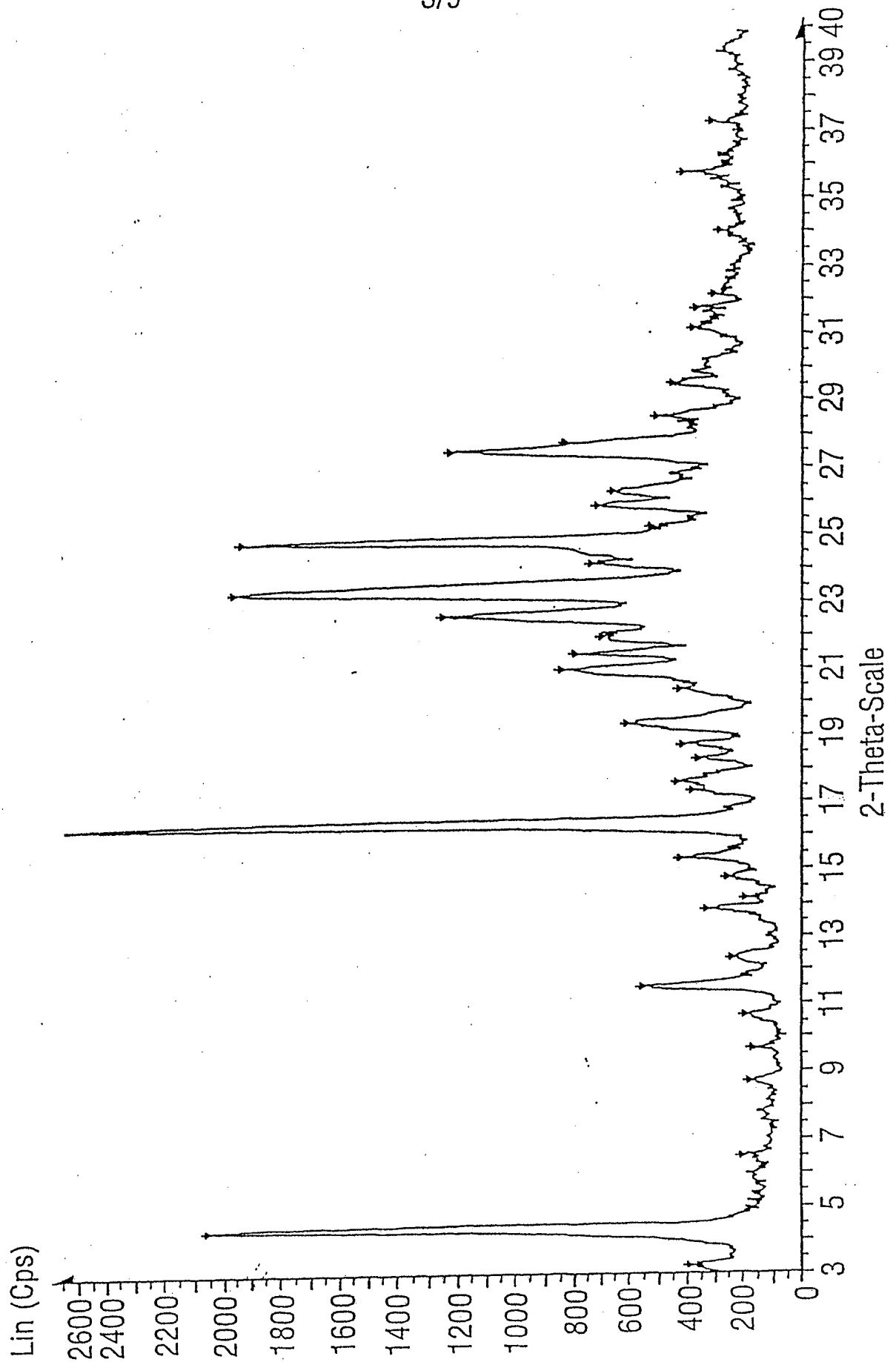
2/9



23.01.04

PV 2003-1315

3/9



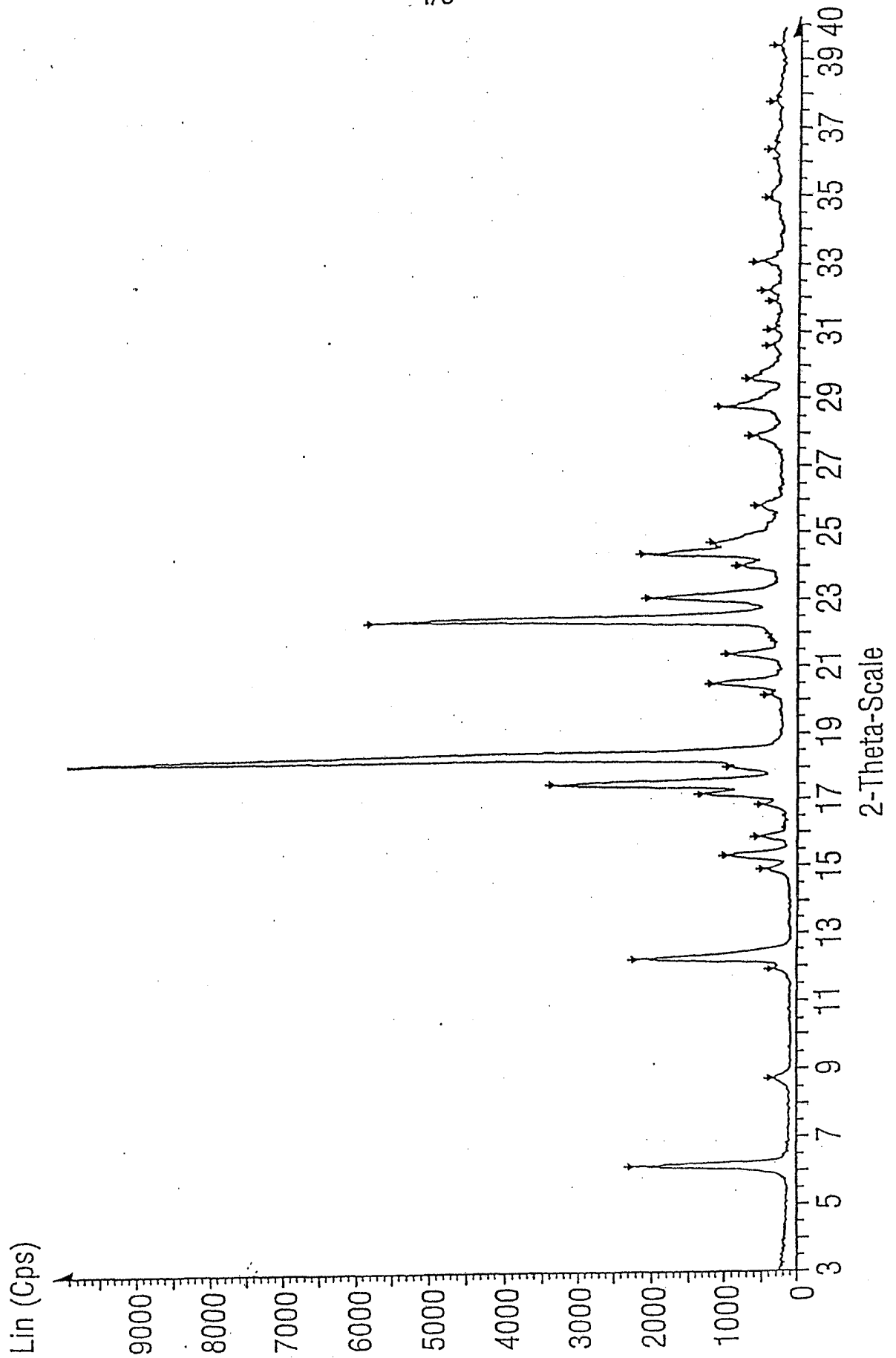
Obr. 3

Mon.

23.01.04

PV 2003-1315

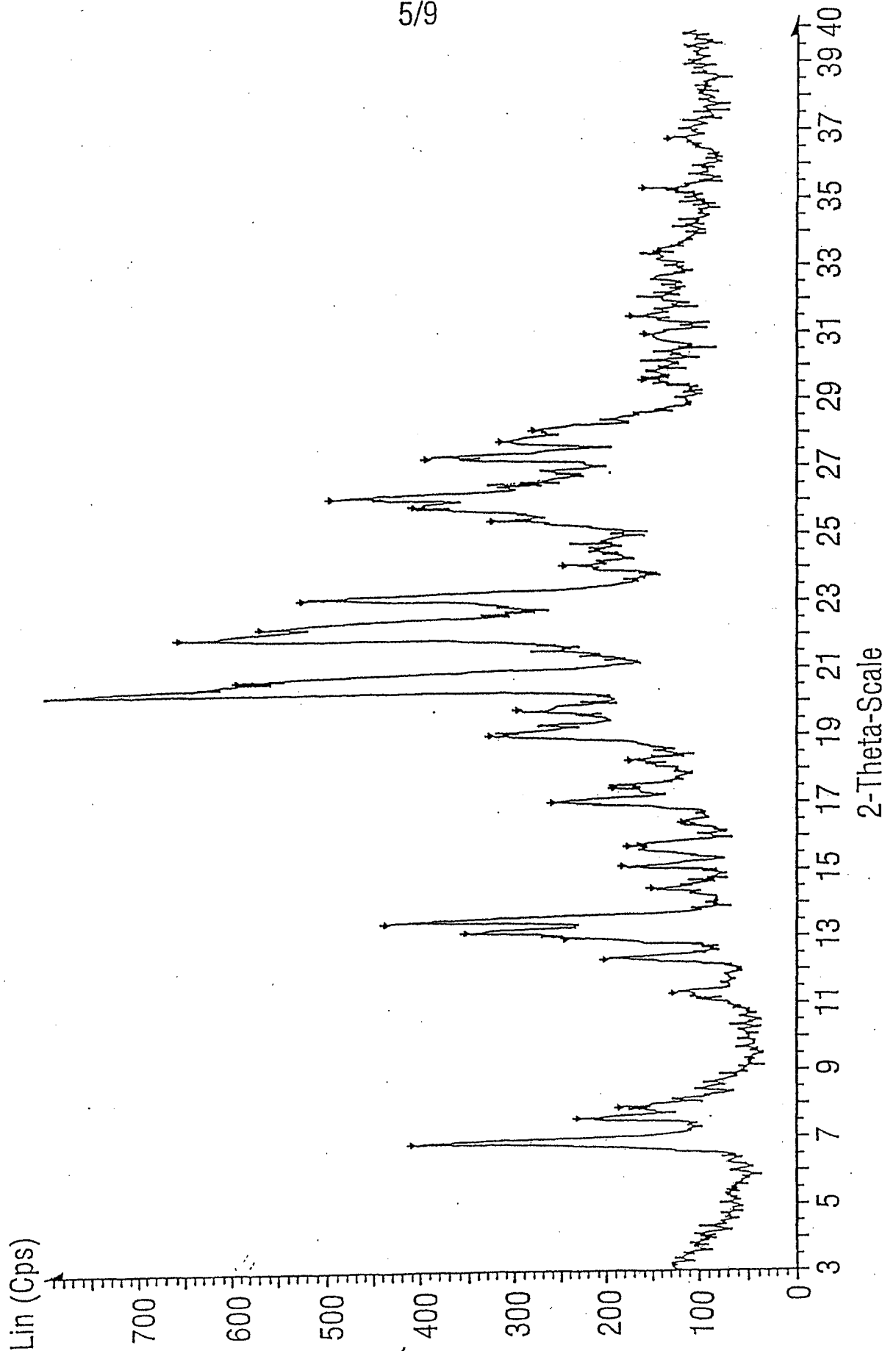
4/9



23.01.04

PV 2003-1315

5/9



Obr. 5

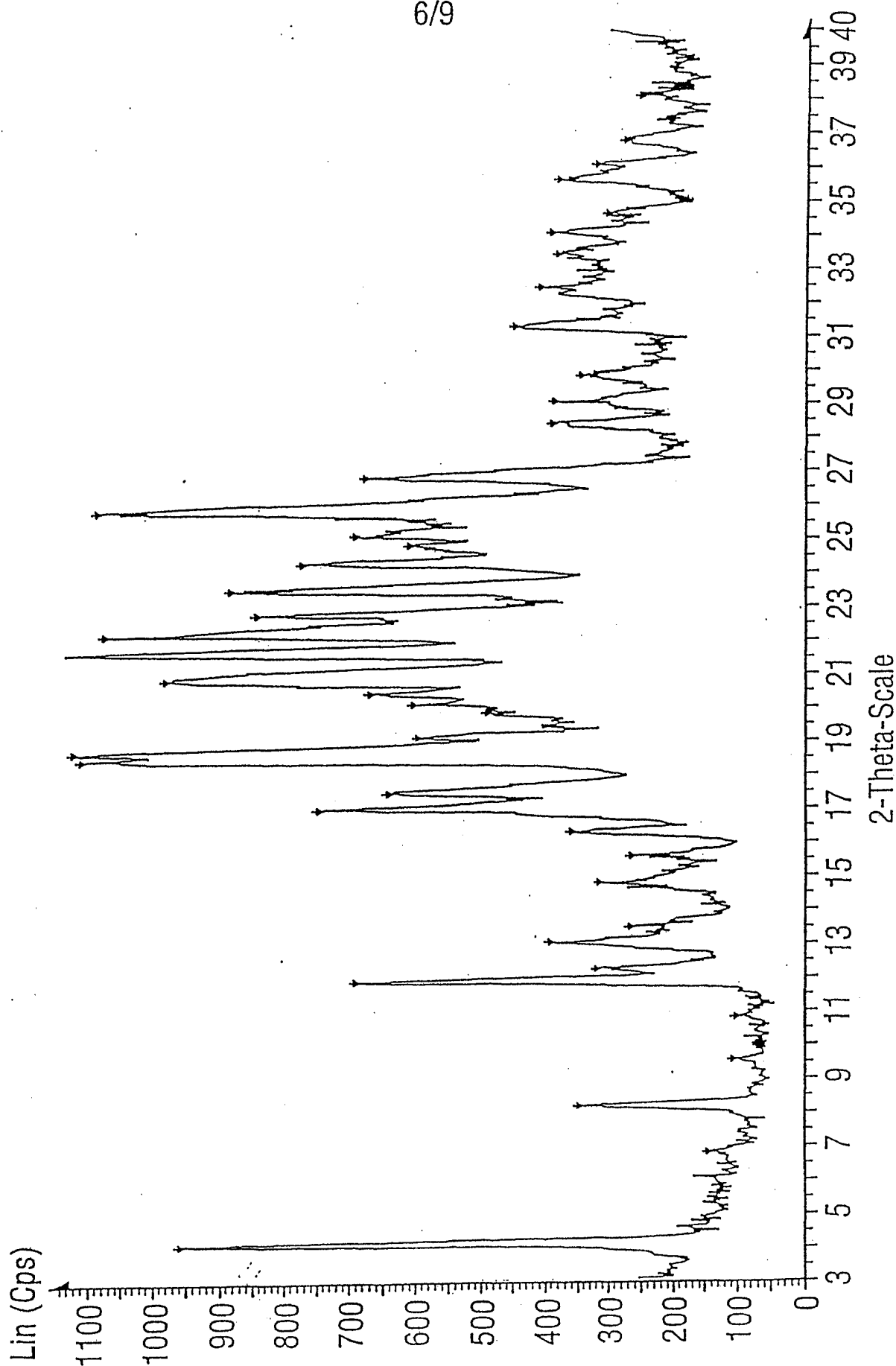
Mon.

230104

PV 2003-1315

W4107-1153

6/9

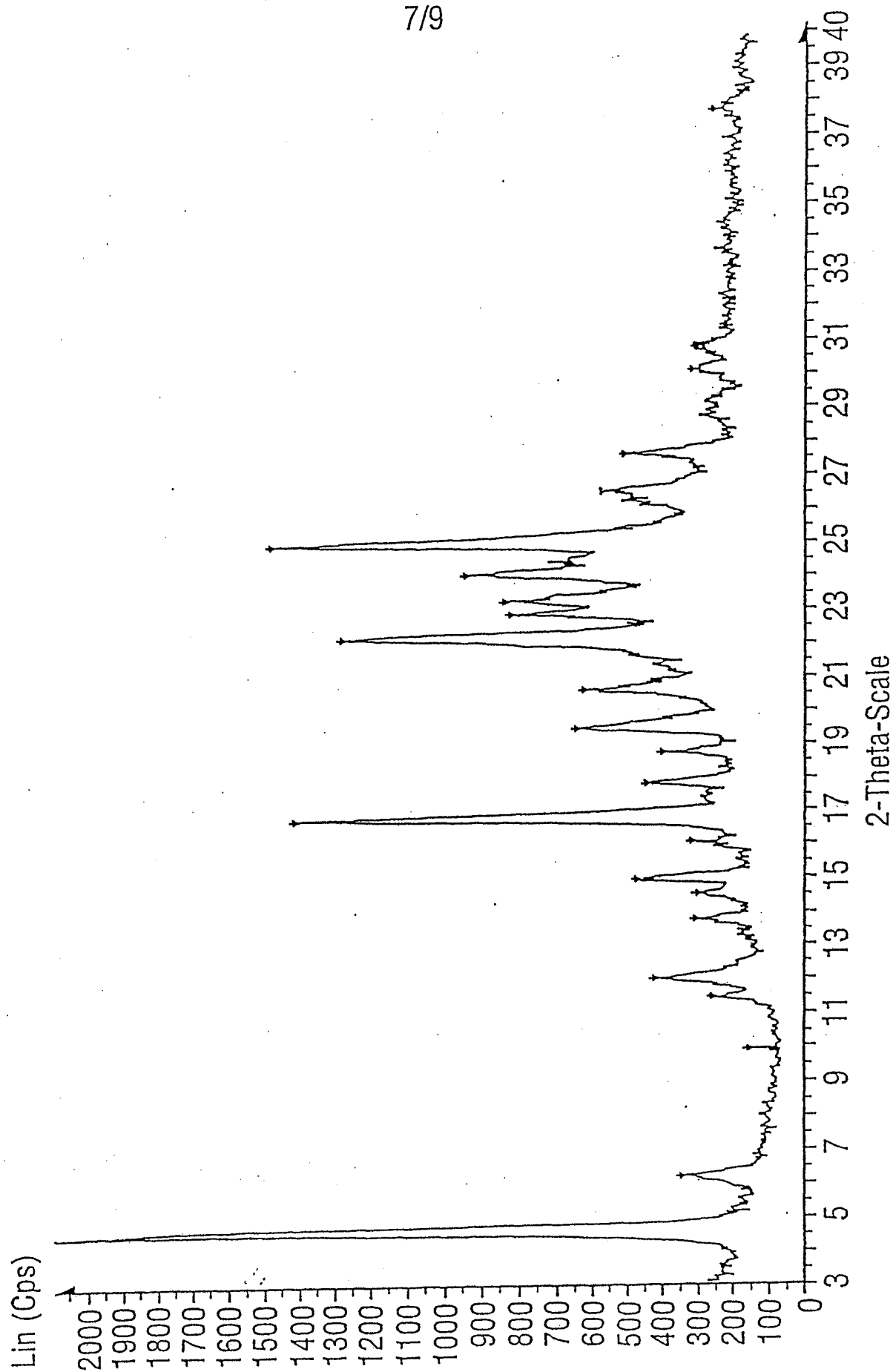


non

230104

PV 2003-1315

7/9



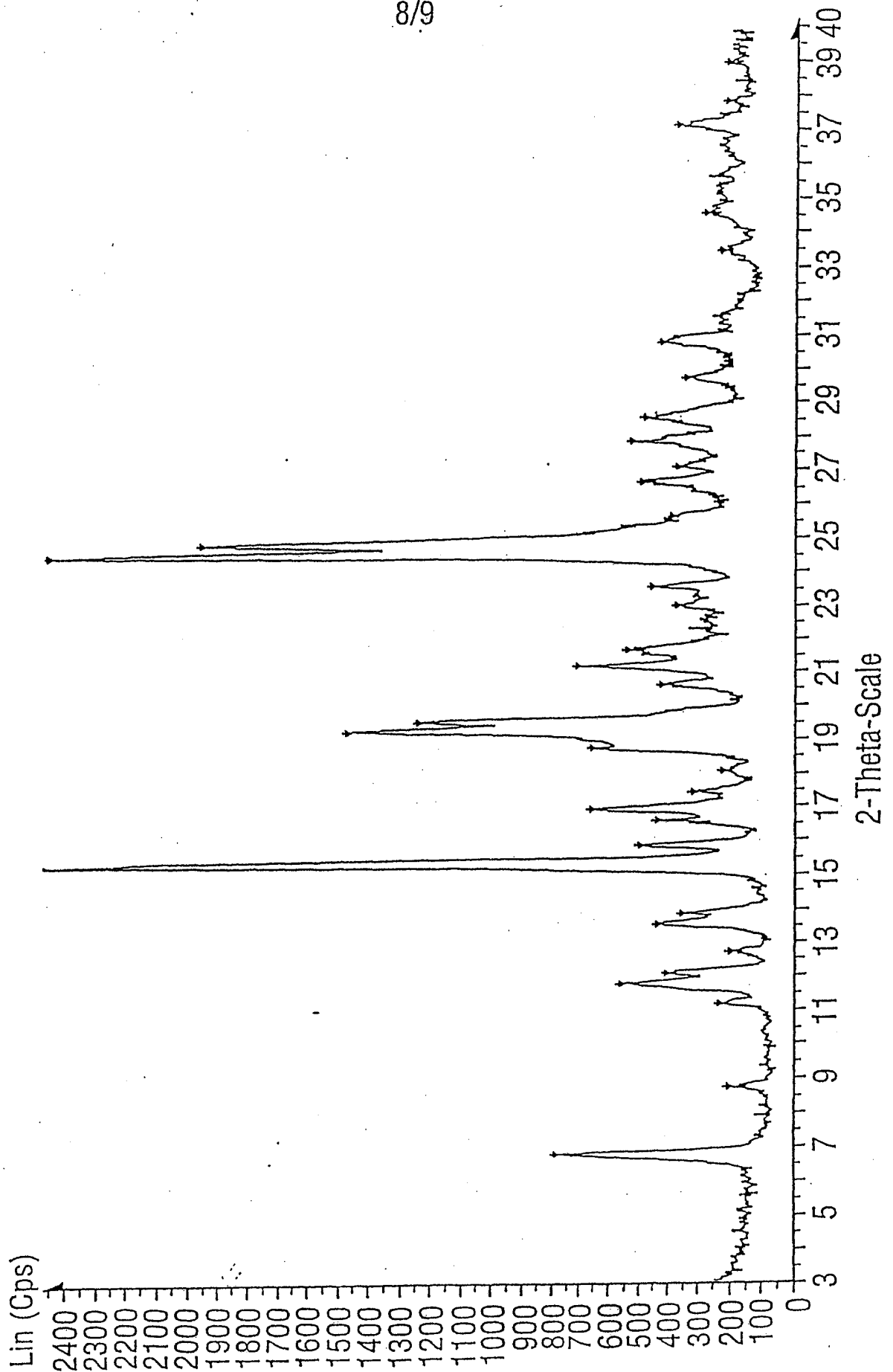
nom.

Obr. 7

23.01.04

PV 2003-1315

8/9



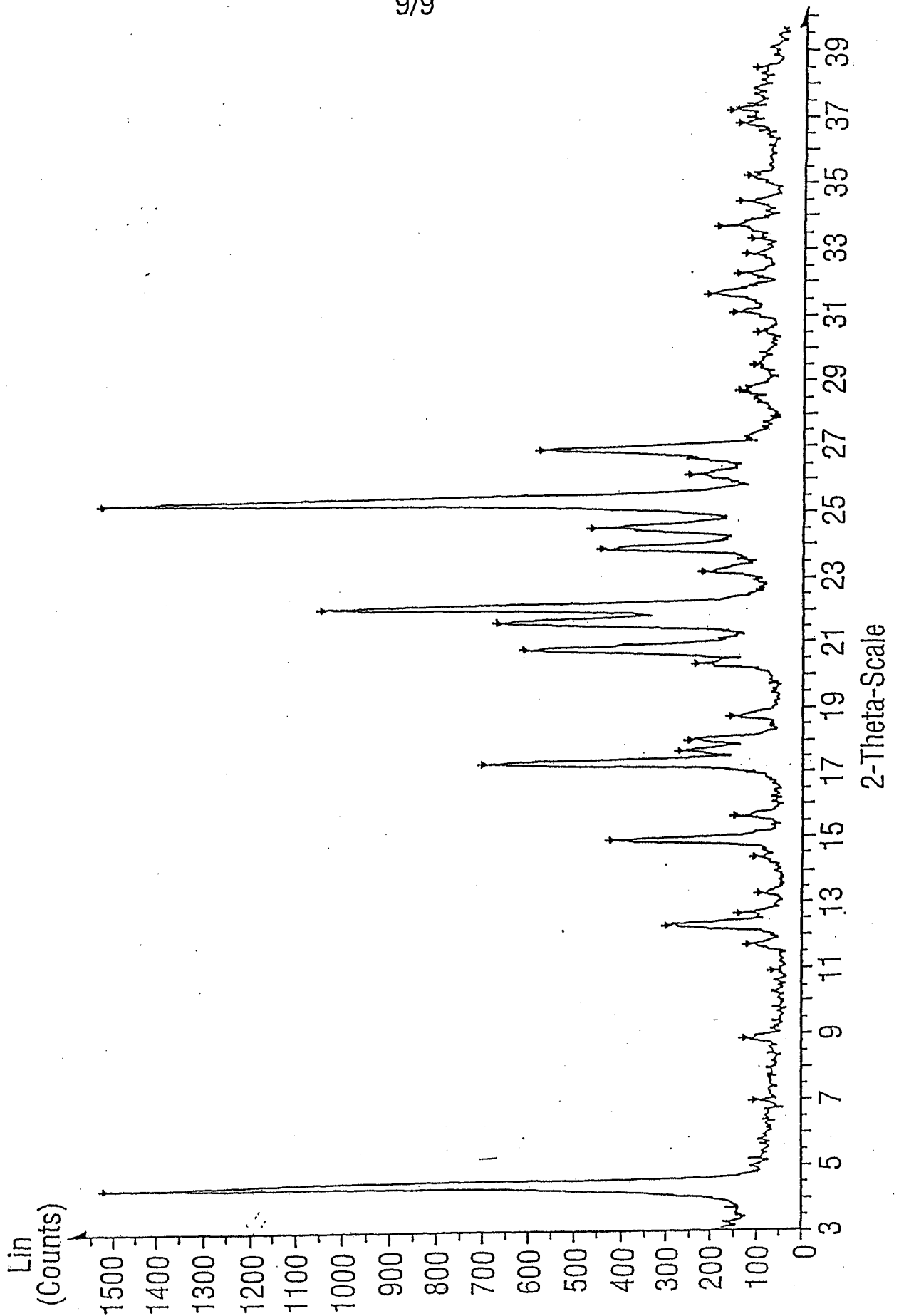
Obr. 8

mom.

23.01.04

PV2003-1315

9/9



Obr. 9

nom.