



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002133868/15, 17.05.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.05.2001

(30) Приоритет: 17.05.2000 US 60/204,935

(45) Опубликовано: 10.04.2006 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2080115 C1, 27.05.1997. US 5340565
C1, 23.08.1994. US 5338753 A, 16.08.1994.
Galve-Roperh et al. Nat. Med. 2000, №6,
p.313-319.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 17.12.2002

(86) Заявка РСТ:
US 01/16150 (17.05.2001)

(87) Публикация РСТ:
WO 01/87297 (22.11.2001)

Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву

(72) Автор(ы):

БЕРСТАЙН Самнер (US),

РЕХТ Лоуренс (US),

ЦУРИЕР Роберт Б. (US)

(73) Патентообладатель(и):

МАНХЭТТАН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ИНК., (US),

РЕХТ Лоуренс (US),

ЦУРИЕР Роберт Б. (US)

(54) КАННАБИНОИДНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и
фармакологии и касается способа снижения
клеточной пролиферации у млекопитающего путем

введения производных тетрагидроканнабинола.

Изобретение обеспечивает повышенную
эффективность снижения клеточной
пролиферации. 16 з.п. ф-лы, 4 ил., 2 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 273 476** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2002133868/15, 17.05.2001**

(24) Effective date for property rights: **17.05.2001**

(30) Priority: **17.05.2000 US 60/204,935**

(45) Date of publication: **10.04.2006 Bull. 10**

(85) Commencement of national phase: **17.12.2002**

(86) PCT application:
US 01/16150 (17.05.2001)

(87) PCT publication:
WO 01/87297 (22.11.2001)

Mail address:
**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. A.P.Agureevu**

(72) Inventor(s):

BERSTAJN Samner (US),

REKht Lourens (US),

TsURIER Robert B. (US)

(73) Proprietor(s):

MANKhEhTTAN FARMAS'JuTIKALZ INK., (US),

REKht Lourens (US),

TsURIER Robert B. (US)

(54) **CANNABINOID DRUGS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves administering
tetrahydrocannabinol derivatives for inhibiting

cell proliferation in mammals.

EFFECT: enhanced effectiveness of treatment.

17 cl, 4 dwg, 2 tbl

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к лечению рака и органической химии.

Уровень техники

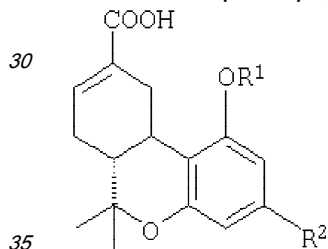
Психотропным агентом в растительном сырье из конопли (*Cannabis*) является тетрагидроканнабинол (THC). Поскольку известно, что THC вызывает различные физиологические эффекты (например, в качестве противовоспалительного средства или анальгетика), отличающиеся от психотропного воздействия, различные производные THC, которые сохраняют желаемую биохимическую или фармакологическую активность THC, исключая возможность злоупотребления или психотропного воздействия, являются

весьма желательными и уже синтезированы как потенциальные лекарственные средства. Одним из свойств THC и его некоторых производных является ингибирование клеточной пролиферации. Однако, эта его активность, так же как и психотропность, зависит от связывания с каннабиноидным рецептором CB 1 (Galve-Roperh et al., Nat. Med. 6:313-319, 2000; De Petrocellis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8375-8380, 1998; и Bisogno et al., Eur. J. Biochem. 254:634-642, 1998). Поэтому не ожидалось, что не обладающие психотропными свойствами производные THC, которые не связываются с CB 1 рецептором (Burnstein, Pharmacol. Ther. 82:87-96, 1999), ингибируют пролиферацию клеток.

Сущность изобретения

Это изобретение основано на обнаружении того факта, что непсихотропные THC-производные, такие как THC-кислоты, могут понижать пролиферацию клеток. Более того, этот эффект не зависит от повышения скорости апоптоза, которая идентифицирована как CB 1 рецептор-опосредованная активность THC (Sanchez et al., FEBS Lett. 436:6-10, 1998).

Соответственно изобретение характеризуется способом снижения клеточной пролиферации у млекопитающих (например, человека) путем определения млекопитающего, для которого желательно снижение клеточной пролиферации, и введения этому млекопитающему соединения формулы I в количестве, эффективном для снижения клеточной пролиферации у этого млекопитающего.



где R¹ представляет собой атом водорода, -COCH₃ или -COCH₂CH₃;

а R² представляет собой разветвленный C₅-C₁₂-алкил. R¹ может быть водородом,

а R² может быть C₉-алкилом, который может быть разветвленным алкилом, например, 1,1-диметилгептилом.

Это соединение может вводиться орально (например, как добавка к рациону), системно, внутривенно или через имплантат, который может обеспечить медленную скорость поступления соединения. Кроме того, соединение может вводиться для лечения предшествующего заболевания или состояния, которое характеризуется клеточной пролиферацией, или для профилактики такого заболевания или состояния. Соединение можно вводить млекопитающему в дозе от около 0,1 до 20 мг/кг массы тела (например, около 0,2-2 мг/кг массы тела) для того, чтобы эффективно снизить пролиферацию клеток. Этот метод особенно полезен при лечении млекопитающего, больного раком.

Кроме этого, клетка *in vitro* может быть приведена во взаимодействие с соединением для того, чтобы снизить или вообще устранить способность клетки к пролиферации.

В используемом здесь смысле "клеточная пролиферация" означает увеличение числа клеток. Под "уменьшением клеточной пролиферации" понимают снижение клеточной пролиферации, что не является исключительным следствием повышения апоптоза.

В используемом здесь смысле "алкил" означает прямую или разветвленную

углеводородную цепочку, содержащую атомы углерода или остатки циклических углеводородов. Эти алкильные группы могут также содержать одну или несколько двойных связей или тройных связей. Под "замещенным алкилом" понимают алкил, в котором атом из алкила замещен атомом, например, серы, кислорода или атомом галогена.

5 Способы данного изобретения обеспечивают новое применение непсихотропных каннабиноидов в качестве лекарственных средств для лечения или профилактики состояния или заболевания, характеризующегося клеточной пролиферацией (например, рака). Благодаря низкой токсичности, непсихотропной природе и невысокому потенциалу злоупотребления этими каннабиноидами, эти соединения могут использоваться как
10 пищевые добавки (например, как ежедневные витаминные пилюли) для предотвращения рака. Кроме этого, эти соединения могут быть применены местно, например, на повреждения кожи, характеризующиеся нежелательной клеточной пролиферацией, например, при псориазе.

Если иное не оговорено, все технические и научные термины, используемые здесь,
15 имеют то же самое значение, которое обычно понимается средним специалистом в данной области, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что подходящие методы и материалы для осуществления или проверки данного изобретения описываются ниже, другие методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что здесь описаны, хорошо известные в данной области, также могут быть использованы. Все публикации,
20 патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые здесь, включены в качестве ссылок во всей их полноте. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет проверено. Кроме того, материалы, методы и примеры носят только иллюстративный характер и их не следует рассматривать как ограничивающие изобретение.

25 Другие особенности и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующих далее подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 показана линейная зависимость количества клеток от концентрации различных соединений.

30 На фиг.2 показан график (в виде колонок) числа клеток в зависимости от концентрации аджудемовой кислоты.

На фиг.3 - линейная зависимость концентрации различных соединений от нейтральных липидов на миллион клеток.

На фиг.4 - линейный график послеинокуляционных дней в зависимости от диаметра
35 опухоли.

Подробное описание

Изобретение относится к способам снижения клеточной пролиферации (например, при лечении рака) у млекопитающего путем введения млекопитающему ТНС производного. Эти ТНС производные (например, соединения формулы I) обладают пониженным
40 психотропным действием или совсем им не обладают и не связываются с СВ 1 рецептором. Такие ТНС производные известны и могут быть синтезированы (см. например, патент US №5338753: Burstein et al., J. Medicinal Chem. 35:3185-2141, 1992; и Burstein, Pharmacol. Ther. 82:87-96, 1999).

ТНС производные могут быть введены любым подходящим методом, например,
45 внутривенно, внутриартериально, местно, путем инъекции, внутривнутрибрюшинно, внутривнутриплеврально, орально, подкожным путем, внутримышечно, сублингвально, интраэпидермальным или ректальным способом. Они могут быть приготовлены в виде раствора, суспензии, суппозитория, таблетки, гранул, порошка, капсул, мази или крема. При приготовлении этих медикаментов могут добавляться растворитель (например, вода
50 или физраствор), солюбилизующий агент (например, этанол, полисорбаты или Cremophor EL7), агент для придания изотоничности, консервирующий агент, антиоксидант, наполнитель (например, лактоза, крахмал, кристаллическая целлюлоза), маннитол, мальтоза, кислый фосфат кальция, ангидрид кремниевой кислоты или карбонат кальция),

связующее (например, крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза, этилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза или аравийская камедь), lubricant (например, стеарат магния, тальк или отвержденные масла) или стабилизатор (например, лактоза, маннитол, мальтоза, полисорбаты, макрозолы или отвержденные полиоксиэтиленом

5 касторовые масла). Если требуется, добавляются глицерин, диметилацетамид, 70% лактат натрия, поверхностно-активное вещество или вещество основной природы, такое как гидроксид натрия, этилендиамин, этаноламин, бикарбонат натрия, аргинин, меглумин или трис-аминометан. Фармацевтические препараты - растворы, таблетки, гранулы или капсулы готовятся вместе с этими компонентами. Композиции для постепенного

10 высвобождения соединения можно приготовить согласно описанному в патенте US 4880 830.

Дозу соединений настоящего изобретения определяют исходя из результатов опытов на животных и различных условий. Очевидно, что более конкретные дозы варьируют в зависимости от способа введения, состояния субъекта, например, его возраста, массы

15 тела, чувствительности, съеденной пищи, дозировочных интервалов, вводимых также медикаментов и источника, тяжести и степени заболевания. Оптимальная доза и частота введения при конкретных условиях должны определяться с помощью соответствующего испытания дозировки специалистом-медиком на основе вышеупомянутых правил.

Перед введением людям ТНС производные должны быть испытаны на биологическую

20 активность (т.е. способность снижать пролиферацию клеток) как *in vitro*, так и *in vivo*. Испытание *in vitro* могут быть проведены, как описано в нижеследующем примере, а также как описано у Marshall et al., Growth Reg. 5:69-84, 1995.

Модельные животные для определения роста опухоли *in vivo* хорошо известны, например, они описаны у Nagane et al., Cancer Res. 60:847-53, 2000; и у Price et al.,

25 Clin. Cancer Res. 5:845-54, 1999.

Далее изобретение будет описано с помощью нижеследующих примеров, которые не ограничивают объема данного изобретения, определенного формулой изобретения. Нижеприведенный пример иллюстрирует применение 1',1'-диметилгептил- Δ^8 -ТНС-11-овой кислоты (известной так же как СТЗ и аджулемовая кислота) для снижения клеточной

30 пролиферации.

Пример

Материалы и методы

Клетки и материалы. Клетки С6 глиомы и U87 глиомы были получены из ATCC (Manassas, VA). Другие линии клеток человека были выращены и сохранялись в Cancer

35 Center Tumor Bank. W138 клетки были получены из Tissue Culture Facility из Медицинского Центра Массачусетского Университета (Worcester, MA). Все химикаты и растворители были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), если не оговорено иное. ТНС и ТНС-11-овая кислота были получены от NIDA. Аджулемовая кислота была синтезирована, как описано у Burstein et al., J.Medicinal Chem. 35:3185-3141, 1992.

40 Исследования пролиферации клеток. Изменения количества клеток *in vitro* измеряли с помощью МТТ исследования, как описано у Marshall'a et al., Growth Reg. 5:69-84, 1995.

Цитометрия в потоке/анализ клеточного цикла. Для потоочной цитометрии клетки выращивали в разбавленной сыворотке (0,5%) в течение двух дней, чтобы синхронизировать клетки G0/G1, после чего их помещали в насыщенную сыворотку (10%)

45 на два дня. Клетки затем метили йодидом пропидиума и фиксировали в 4% параформальдегиде. Затем клетки проверяли с помощью MoFlo Facs сортирующего устройства на содержание ДНК.

Анализ включения липидов. Клетки обрабатывали следующим образом. Готовили монослои С-6 клеток в 24-луночном культуральном планшете, как описано выше. Карбокси-меченную С¹⁴-арахидоновую кислоту (150000 распадов в минуту/на лунку), полученную от ARC, St. Louis. MO (специфическая активность 55 мКю/ммоль), добавляли в каждый

50 монослой и инкубировали в течение 2 часов.

Обработку указанным каннабиноидом начинали с прибавления его в 10 μ л ДМСО к 1 мл

культуральной среды, покрывающей каждый монослой. Обработка длилась в течение 48 часов, если не указано иного. После этой инкубации среду отделяли и отбрасывали. После двукратного промывания, каждый раз 1 мл PBS, клеточные липиды экстрагировали в течение 1 часа 0,5 мл абсолютного этанола при комнатной температуре. Все стадии

5 обработки осуществлялись для четырех повторностей. Контрольные клетки обрабатывали также, за исключением того, что не присутствовал каннабиноид.

Для выполнения серийного анализа экстрагированных липидов образцы липидов были лиофилизированы. До выпаривания в вакууме был добавлен ^{14}C -холестерин (50000 распадов в минуту) как маркер выделения (ARC, St. Louis MO; специфическая активность

10 50 $\mu\text{Кюри/ммоль}$). Остатки проб были затем растворены в 30 $\mu\text{л}$ порциях метанола, содержащих по 10 $\mu\text{г}$ стероил-арахидоноил-диглицерида, триолеина и лецитина, и нанесены на тонкослойные (0,25 мм) пластины из силикагеля. Первую элюцию осуществляли, используя смесь 9:1 дихлорметана и ацетона, с целью анализа нейтральных липидов. Величины R_f для стандартов следующие: лецитин = 0, холестерин =

15 0,38, диглицерид = 0,64, триглицерид = 0,81. После количественного определения нейтральных липидов проводили вторую элюцию смесью (50:25:8:4) хлороформа, метанола, уксусной кислоты и воды в качестве элюента для анализа фосфолипидов. Величина R_f лецитина составила 0,33. DG и TG двигались во фронте растворителя. Все стандартные величины определялись при выдержке в парах иода.

Меченые липиды количественно определяли следующим образом. Зоны радиоактивности детектировали, подвергая пластины экспозиции с рентгенограммой на пленке в течение 48 часов. TIFF компьютерный файл пленки воспроизводился с помощью Flour-S System (Biorad). Хроматограммы оценивали с помощью NIH Image программного

20 обеспечения. С помощью дисплея оценивали величины высоты пиков, так как для всех меченых компонентов на хроматограммах были характерны узкие остроконечные пики. Количество каждого компонента было подобрано для выделения с использованием стандартных величин холестерина индивидуально для каждой зоны. Полученные величины были затем разделены на число клеток в каждой лунке, а результаты были выражены как показатель на миллион клеток.

30 Определение протеинкиназы C (PKC). Клетки переносили в MEM среду (0,5% сыворотка) и культивировали в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывали либо ДМСО, либо 25 μM аджулемовой кислоты в течение специально определенного времени инкубации, после чего планшеты подвергали трипсинизации. 5×10^6 трипсинизированных клеток исследовали на PKC активность с помощью набора (Calbiochem, cat. no. 53984).

35 Модели для подкожного введения in vivo 10^6 U87 клеток вводили в мышцу на правом боку мыши-самца nu/nu BALBc (Charles River). Спустя два дня после инокуляции мыши получили или 0,1 мг/кг аджулемовой кислоты в 0,05 мл сафлорового масла, или 0,05 мл сафлорового масла при оральном введении. После этого такие же дозировки вводились каждые понедельник, среду и пятницу. Когда появились заметные опухоли, размер

40 опухолей вычисляли усреднением величин измеренных двух перпендикулярно расположенных диаметров. Видимые на глаз опухоли измеряли через несколько дней после введения лекарства.

Результаты

45 Для того чтобы оценить потенциал роста, проводили МТТ исследование, при этом было отмечено, что и Δ^9 -THC, и THC-11-овая кислота и аджулемовая кислота ингибировали клетки С6 глиомы в дозе, зависимой от способа введения, с IC_{50} -величинами в 10, 20 и 55 μM соответственно (Фиг.1). Исследовалась пролиферация ряда клеточных линий человека, полученных из различных типов рака (мозга, молочной железы, мочевого

50 пузыря, языка и простаты) в зависимости от чувствительности (сенситивности) к каждому из указанных агентов, взятых в количестве 25 μM , в течение 48 часов.

При такой дозировке аджулемовая кислота ингибировала пролиферацию клеток лучше, чем THC или THC-1-овая кислота (Согласно используемому здесь определению "THC"

означает Δ^8 или Δ^9 -THC). Степень ингибирования была $61,3 \pm 12,1$, $39,4 \pm 22,0$ и $13,1 \pm 18,5\%$ (значение $\pm SD$) для аджулемовой кислоты, THC и THC-11-овой кислоты, соответственно, с $p < 0,001$ в одностороннем ANOVA, при попарном множественном сравнении (способ Student - Newman-Keuls'a), как показано в Таблице 1.

Таблица 1

Процент ингибирования роста клеточной линии рака через 48 часов МТТ-исследования				
Линия	Источник ткани	Δ^9 THC (25 μ M)	Аджулемовая кислота (25 μ M)	THC-11-овая кислота (25 μ M)
U87	Мозг	20 ± 5	54 ± 2	5 ± 1
U373	Мозг	0	34 ± 1	0
U118	Мозг	39 ± 5	60 ± 2	14 ± 3
A172	Мозг	42 ± 5	76 ± 1	61 ± 2
HS 578 T	Молочная железа	52 ± 5	60 ± 2	2 ± 1
HT 1376	Мочевой пузырь	23 ± 5	60 ± 2	21 ± 12
J 82	Мочевой пузырь	63 ± 6	57 ± 3	1 ± 1
Calu 6	Легкое	28 ± 5	69 ± 3	19 ± 5
Du 145	Простата	55 ± 7	74 ± 2	7 ± 3
PC3	Простата	72 ± 2	69 ± 2	1 ± 1

По сравнению с THC аджулемовая кислота была значительно более эффективна ($p < 0,05$) при этой дозировке в шести из десяти тестируемых линий.

Эти три каннабиноиды ингибировали также клеточную линию нормальных фибробластов крысы WI38. Однако, можно отметить, что в отличие от THC, аджулемовая кислота ингибировала пролиферацию WI38 клеток в меньшей степени, чем пролиферацию клеток С6 глиомы. Например, в трех разных опытах при дозировке в 25 μ M Δ^9 -THC ингибировала пролиферацию WI38 клеток на 66% по сравнению с 50% для С6 клеток. Напротив, инкубация с аджулемовой кислотой в течение двух дней приводила к противоположному эффекту. Так что имела место 65% степень ингибирования в отношении С6 по сравнению с 44% в отношении WI38 клеток. Эти данные наводят на мысль о том, что аджулемовая кислота была более токсичной к опухолевым, чем к нормальным клеткам.

Чтобы определить, было ли действие аджулемовой кислоты рецептор-опосредованным, препарат, обогащенный на 95% D-изомером аджулемовой кислоты, использовали для проверки стереоспецифичности наблюдаемого вышеуказанного эффекта. Дана шкала уменьшения эффективности 25 μ M-овой дозы D-изомера по сравнению с L-изомером аджулемовой кислоты ($p < 0,001$, t-тест) (Фиг.2). Этот результат подтвердил мнение, что активность аджулемовой кислоты была связана со стереоспецифичностью и потому весьма вероятно была рецептор-опосредованной.

Три характерные особенности проявления действия аджулемовой кислоты на опухолевые клетки дают возможность предположить, что это действие было опосредованно связано с механизмом, отличающимся от такового для Δ^9 -THC. Во-первых, ингибирование пролиферации клеток под воздействием указанного соединения не было обратимым с CB 1 антагонистом. Совместное инкубирование клеток С6 глиомы и 3,2 μ M специфического антагониста привело к 150% снижению эффективности THC по сравнению со слабым потенцированием (усилением действия) аджулемовой кислоты (Фиг.3). Этот результат показывает, что большая доля противоопухолевого действия THC является CB 1 рецептор-опосредованной, тогда как у аджулемовой кислоты не является.

Во-вторых, противоопухолевая активность аджулемовой кислоты была связана с маркированным увеличением числа клеток после 48-часовой выдержки с этим соединением. Для того чтобы исследовать этот эффект глубже, определяли влияние аджулемовой кислоты на динамику клеточного цикла. Клетки С6 глиомы инкубировали в течение 24 часов в среде, содержащей 0,5% сыворотки, чтобы синхронизировать их в G1/G0. Затем клетки выдерживали в среде, содержащей 10% сыворотку, с или без аджулемовой кислоты (25 μ M) в течение двух дней. Как показано в таблице 2, увеличившееся количество обработанных клеток было видно как в S фазе (от 4,4% до

13,0%, $p=0,003$, t -тест), так и в G2/M фазе (от 21,9% до 32,3%, $p=0,005$, t -тест) клеточного цикла, что давало возможность предположить, что обработанные клетки могли синтезировать ДНК, но не были способны завершить митоз. Важно, что степень апоптоза (что определяли по отсутствию суб-G0 клеток как в контрольных, так и в обработанных клетках) была не повышенной.

Таблица 2 Анализ клеточного цикла контрольных и АЖА-обработанных клеток С6 глиомы			
	G0/G1 (значение% $\pm$ SD)	S (значение% $\pm$ SD)	G2/M (значение% $\pm$ SD)
Контроль	46,3 $\pm$ 3,6	4,4 $\pm$ 0,3	21,9 $\pm$ 1,1
АЖА-обработанные	39,1 $\pm$ 1,3*	13,0 $\pm$ 2,3**	32,3 $\pm$ 3,00***
* $p<0,02$, ** $p=0,003$, *** $p=0,005$, все определяли в t -тесте.			

В-третьих, другой отличительной чертой противоопухолевого действия аджулемовой кислоты было появление рефрактивных телец, которые можно было легко увидеть с помощью фазовой микроскопии. Число клеток, которые имели рефрактивные тельца, так же как и величина отношения рефрактивные тельца/клетки, увеличилась "сверх плана". Спустя 48 часов 83% обработанных аджулемовой кислотой С6 клеток имели одно или несколько рефрактивных тел, по сравнению с 27% для ТНС-обработанных клеток ($p<0,001$), анализ Chisquare). Показатель количества рефрактивных телец на клетку был также значительно выше для клеток, обработанных аджулемовой кислотой, по сравнению с ТНС-обработанными клетками (1,78 $\pm$ 1,6 против 0,22 $\pm$ 0,5 на клетку, $p<0,001$, t -тест). Интересно, что рефрактивные тельца не были замечены ни в WI38 клетках, обработанных в течение всего отпущенного времени при указанной дозировке аджулемовой кислоты, ни в клетках С6 глиомы, обработанных 25 μ M ТНС-11-овой кислотой.

Для того чтобы далее исследовать природу роста клеток и рефрактивных телец, клетки подвергали электронному микроскопированию. Обработанные аджулемовой кислотой клетки не были ни в состоянии апоптоза, ни некротическими. Фактически эти клетки являлись метаболически активными. Это совпадает и с другими аналогичными наблюдениями того, что пролиферация клеток заметно ингибируется аджулемовой кислотой; обработанные клетки обладали высокой (>95%) степенью жизнеспособности, что определялось по исключению возможности окрашивания трипаном в голубой цвет и в связи с быстрой регенерацией после удаления лекарства. Кроме того, клетки, обработанные аджулемовой кислотой, были увеличенными и содержали крупные капли жира, которые были идентифицированы путем обесцвечивания тетрахлоридом осмия.

Для исследования источника повышенного содержания липидов, С6 клетки выращивали и обрабатывали 25 μ M дозой каннабиноида в присутствии 14 C-меченной арахидоновой кислоты. При сравнении клеток, которые были обработаны другим средством (не каннабиноидом), ТНС или ТНС-11-овой кислотой, значительное увеличение свыше базовых уровней было отмечено только в отношении аджулемовой кислоты ($p<0,05$, Dunnet's тест множественных сравнений по отношению к контролю) спустя 48 часов инкубации (Фиг.3). При этой дозе аджулемовой кислоты содержание и три-, и диглицеридов превышало более чем в три раза контрольные значения.

Что касается фосфатидилхолина при каких-либо обработках каннабиноидами, то, напротив, никакого значительного повышения его уровня обнаружено не было.

Аналогичный результат был получен после инкубации с 14 C-меченной олеиновой кислотой.

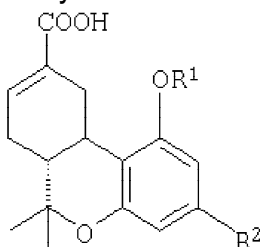
Поскольку диацилглицерин (DAG) является важным сигнальным трансдуктором протеинкиназы С, проверяли влияние обработки аджулемовой кислотой на РКС активность в С6 клетках. После выдержки с аджулемовой кислотой РКС активность увеличивалась в течение пяти минут и оставалась приблизительно в два раза более высокой, чем контрольное значение, в течение одного часа, что дает возможность предполагать, что РКС принимает участие в вызываемом аджулемовой кислотой ингибировании клеточной пролиферации. Существует, по крайней мере, два альтернативных объяснения

наблюдаемому явлению: (1) изозимы РКС, которые были простимулированы, были изозимами, обеспечивающими медленный рост, как например, PKCS; и (2) увеличившееся количество DAG регулировало какой-то другой следующий медиатор, например, β -химерин, в большей степени, так что равновесие сдвигалось в направлении антипролиферации.

Проявляет ли аджулемовая кислота *in vivo* противоопухолевую активность, определяли на моделях опухолей бесшерстных мышей. Рост клеток линии U87 глиомы человека, инъектированных подкожно бесшерстным мышам, оценивали при введении аджулемовой кислоты и без нее. В этих экспериментах обработку аджулемовой кислотой начинали проводить спустя два дня после инокулирования мыши 10^6 клеток опухоли. Уменьшение как появления, так и размера опухолей наблюдали в группе, получающей 0,1 мг/кг аджулемовой кислоты трижды в неделю (Фиг.4). На 25-й день после заражения 5 из 5 контрольных мышей имели опухоли с значением диаметра $16,3 \pm 3,2$ мм, тогда как значение диаметра в обработанной группе было $3,8 \pm 8,5$ мм ($n=5$, $p=0,015$, t -тест). Эти полученные *in vivo* результаты подтверждают способность аджулемовой кислоты ингибировать пролиферацию клеток, в данном случае - в опухоли.

Формула изобретения

1. Способ снижения клеточной пролиферации у млекопитающего, включающий введение этому млекопитающему соединения формулы



где R¹ представляет собой атом водорода, -COCH₃ или -COCH₂CH₃;

R² представляет собой разветвленный C₅-C₁₂-алкил, в количестве, эффективном для снижения клеточной пролиферации у млекопитающего.

2. Способ по п.1, где R¹ представляет собой водород.

3. Способ по п.2, где R² представляет собой C₉-алкил.

4. Способ по п.3, где C₉-алкил является разветвленным алкилом.

5. Способ по п.4, где разветвленный алкил является 1,1-диметилгептилом.

6. Способ по п.1, где R² представляет собой C₉-алкил.

7. Способ по п.6, где C₉-алкил является разветвленным алкилом.

8. Способ по п.7, где разветвленный алкил является 1,1-диметилгептилом.

9. Способ по п.1, в котором млекопитающее является человеком.

10. Способ по п.1, где соединение вводится орально.

11. Способ по п.1, где соединение вводится системно.

12. Способ по п.1, где соединение вводится через имплантат.

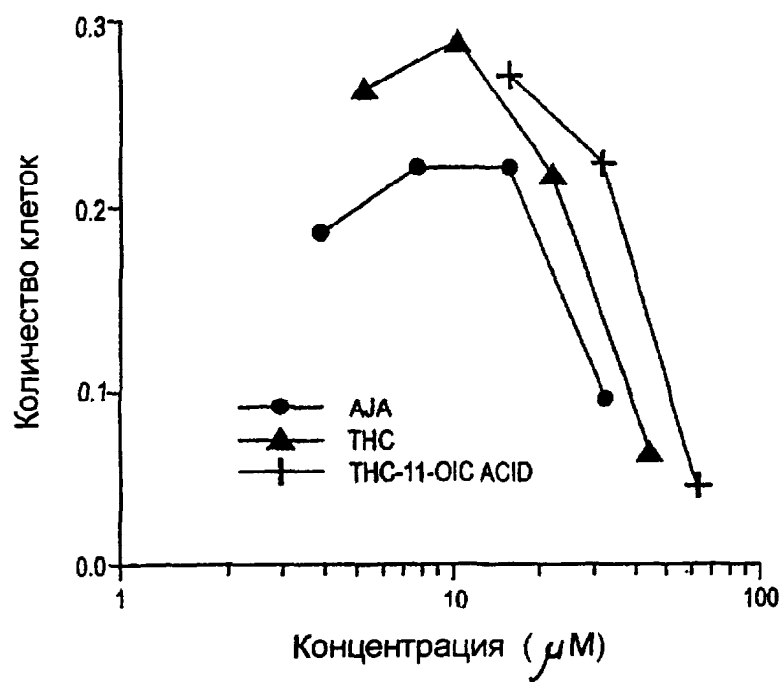
13. Способ по п.12, где имплантат обеспечивает медленное выделение соединения.

14. Способ по п.1, где соединение вводится внутривенно.

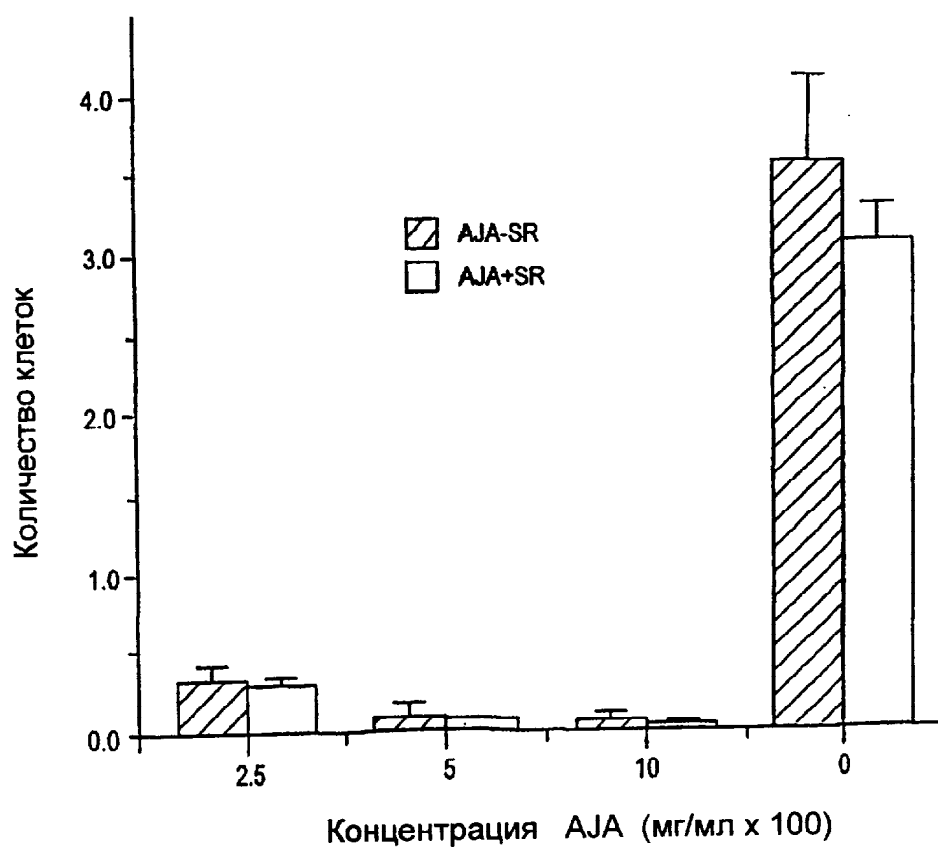
15. Способ по п.1, где клеточная пролиферация связана с раком.

16. Способ по п.1, где количество вводимого соединения составляет от около 0,1 до 20 мг/кг массы тела млекопитающего.

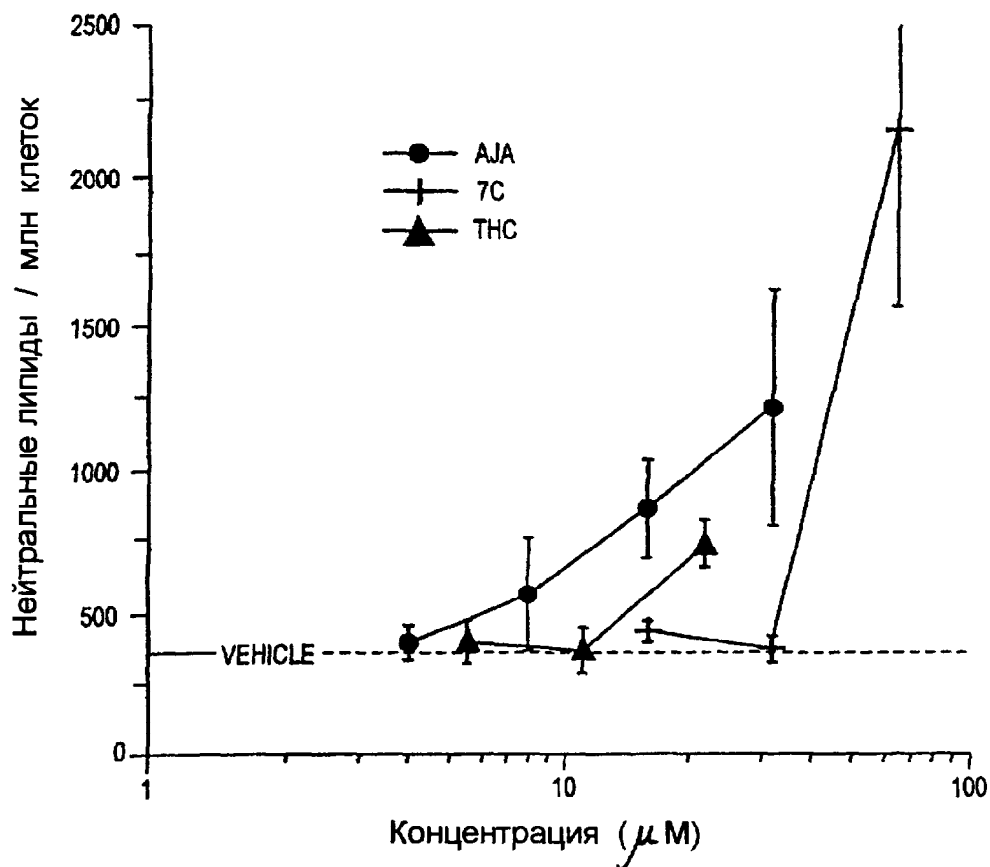
17. Способ по п.16, где количество вводимого соединения составляет от около 0,2 до 2 мг/кг массы тела млекопитающего.



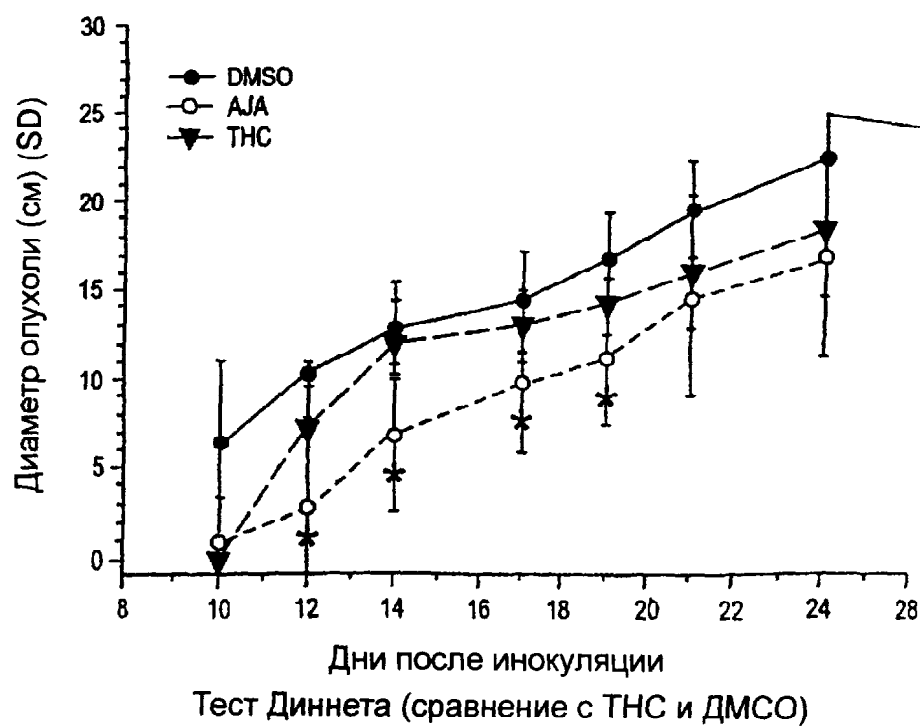
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4