

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031604**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.01.31

(21) Номер заявки
201690623

(22) Дата подачи заявки
2014.10.24

(51) Int. Cl. *A01N 37/00* (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
C07C 62/00 (2006.01)

(54) ТРЕПРОСТИНИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 61/895,680; 61/910,703; 61/950,967;
62/028,758; 62/042,123

(32) 2013.10.25; 2013.12.02; 2014.03.11;
2014.07.24; 2014.08.26

(33) US

(43) 2016.11.30

(86) PCT/US2014/062232

(87) WO 2015/061720 2015.04.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНСМЕД ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(72) Изобретатель:
**Малинин Владимир, Перкинс Уолтер,
Лейфер Франциска, Коничек Донна,
Ли Чжили, Плотт Адам (US)**

(74) Представитель:
Поликарпов А.В. (RU)

(56) US-A1-20130261187
US-A-4837342

(57) В изобретении представлены соединения и содержащие их композиции. Более конкретно, описаны соединения, содержащие трепростинил, ковалентно связанный посредством сложноэфирной связи с тетрадецилом, пентадецилом, гексадецилом, гептадецилом или октадецилом либо посредством амидной связи с линейным C₅-C₁₈алкилом. Также предложены способы лечения легочной гипертензии (например, легочной артериальной гипертензии) и портолегочной гипертензии.

B1**031604****031604****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка имеет приоритет предварительной заявки на патент США серийный № 62/042123, поданной 26 августа 2014 г.; предварительной заявки на патент США серийный № 62/028758, поданной 24 июля 2014 г.; предварительной заявки на патент США серийный № 61/950967, поданной 11 марта 2014 г.; предварительной заявки на патент США серийный № 61/910703, поданной 2 декабря 2013 г.; предварительной заявки на патент США серийный № 61/895680, поданной 25 октября 2013 г.; каждая из которых во всей ее полноте для всех целей включена в данное описание посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

Легочная гипертензия (РН) характеризуется аномально высоким давлением крови в сосудистой сети легких. Она является прогрессирующим, летальным заболеванием, которое приводит к сердечной недостаточности и может возникать в легочной артерии, легочной вене или легочных капиллярах. Симптоматически пациенты испытывают одышку, головокружение, потерю сознания и другие симптомы, и все они ухудшаются при напряжении. Существует множество причин, и они могут иметь неизвестное происхождение, идиопатическое, и могут приводить к гипертензии в других системах, например к портальной гипертензии, при которой пациенты имеют как портальную, так и легочную гипертензию.

Согласно классификации Международной организации здравоохранения (WHO) легочная гипертензия подразделяется на пять групп. Группа I называется легочной артериальной гипертензией (РАН) и включает в себя РАН, которая не имеет известной причины (идиопатическую), наследственную РАН (т.е. семейную РАН, или ФРАН), РАН, вызываемую лекарственными средствами или токсинами, и РАН, вызываемую такими состояниями, как заболевания соединительной ткани, ВИЧ-инфекция, заболевание печени и врожденный порок сердца. Легочная гипертензия группы II характеризуется как легочная гипертензия, связанная с заболеванием левых отделов сердца. Легочная гипертензия группы III характеризуется как РН, связанная с заболеваниями легких, такими как хроническая обструктивная болезнь легких и интерстициальные заболевания легких, а также РН, связанная с расстройствами дыхания во сне (например, апноэ во сне). РН группы IV представляет собой РН вследствие хронического тромботического и/или эмболического заболевания, например РН, вызванную сгустками крови в легких или расстройствами свертывания крови. Группа V включает в себя РН, вызванную другими расстройствами или состояниями, например болезнями крови (такими как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия), системными расстройствами (такими как саркоидоз, васкулит), метаболическими расстройствами (такими как заболевание щитовидной железы, гликогеноз).

Легочная артериальная гипертензия (РАН) поражает приблизительно 200000 людей во всем мире и из них приблизительно 30000-40000 пациентов в Соединенных Штатах. РАН-пациенты испытывают сужение легочных артерий, которое приводит к высокому легочному артериальному давлению, затрудняющему накачивание крови сердцем в легкие. Пациенты страдают одышкой и усталостью, которые часто серьезно ограничивают возможность осуществлять физическую деятельность.

Нью-Йоркская ассоциация кардиологов (The New York Heart Association (NYHA)) распределяет РАН-пациентов по четырем функциональным классам по степени тяжести заболевания. РАН-пациенты класса I согласно классификации NYHA не имеют ограничения физической деятельности, так как обычная физическая деятельность не вызывает чрезмерные диспноэ или усталость, боль в груди или околообморочные состояния. Лечение не является необходимым для РАН-пациентов класса I. РАН-пациенты класса II согласно классификации NYHA имеют небольшое ограничение физической деятельности. Этим пациентам комфортно в состоянии покоя, но обычная физическая деятельность вызывает чрезмерные диспноэ или усталость, боль в груди или околообморочные состояния. РАН-пациенты класса III согласно классификации NYHA имеют заметное ограничение физической деятельности. Хотя им комфортно в состоянии покоя, РАН-пациенты класса III испытывают чрезмерные диспноэ или усталость, боль в груди или околообморочные состояния в результате менее чем обычной физической деятельности. РАН-пациенты класса IV согласно классификации NYHA неспособны осуществлять какую-либо физическую деятельность без симптомов. РАН-пациенты класса IV могут испытывать диспноэ и/или усталость в состоянии покоя, и дискомфорт увеличивается при любой физической деятельности. У РАН-пациентов класса IV часто проявляются признаки недостаточности правого желудочка.

Пациентов с РАН лечат антагонистом рецептора эндотелина (ERA), ингибитором фосфодиэстеразы типа 5 (PDE-5), стимулятором гуанилатциклазы, простаноидом (например, простациклином) или их комбинацией. ERA включают абрисентан (Letairis®), ситаксентан, босентан (Tracleer®) и мацитантан (Opsumit®). Ингибиторы PDE-5, показанные для лечения РАН, включают силденафил (Revatio®), тадалафил (Adcirca®). Простаноиды, показанные для лечения РАН, включают илопрост, эпопросентол и трепростинил (Remodulin®, Tyvaso®). Одним из одобренных стимуляторов гуанилатциклазы является риоцигуат (Adempas®). Кроме того, пациентов часто лечат комбинациями вышеупомянутых соединений.

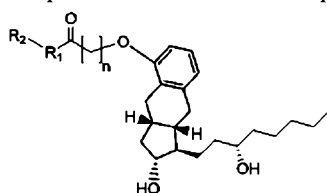
Портолегочную гипертензию определяют по совместному существованию портальной и легочной гипертензии, и она является серьезным осложнением заболевания печени. Диагноз портолегочной гипертензии ставят на основе гемодинамических критериев: (1) портальная гипертензия и/или заболевание печени (клиническая диагностика - асциты/варикозное расширение вен/спленомегалия), (2) среднее ле-

гочное артериальное давление >25 мм рт.ст. в покое, (3) резистентность легочных сосудов >240 дин с/см^5 , (4) давление окклюзии легочной артерии <15 мм рт.ст. или транспульмонарный градиент >12 мм рт.ст. РРН (портолегочная гипертензия) является серьезным осложнением заболевания печени, и она имеется у 0,25-4% пациентов, страдающих циррозом. В настоящее время РРН является сопутствующим заболеванием у 4-6% пациентов, направляемых на трансплантацию печени.

Несмотря на то, что имеются виды лечения для РАН и РРН, современные простациклиновые терапии связаны с серьезными проблемами токсичности и переносимости, а также неудобными режимами и схемами приема доз. Настоящее изобретение направлено на преодоление этих факторов за счет создания соединений и схем лечения, которые обеспечивают меньшую токсичность, лучшую переносимость и более удобные режимы и схемы приема доз.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте изобретения предложено соединение формулы (II)



Формула (II),

где R_1 представляет собой O; R_2 представляет собой тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил или октадецил; и n означает 1.

В одном воплощении изобретения R_2 представляет собой тетрадецил. В другом воплощении R_2 представляет собой пентадецил. В еще одном воплощении R_2 представляет собой гексадецил. В еще одном воплощении R_2 представляет собой гептадецил. В еще одном воплощении R_2 представляет собой октадецил. В дополнительном воплощении R_2 является линейным. В еще одном дополнительном воплощении R_2 является разветвленным.

В другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (PH) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение формулы (II) и амфифильный агент. В одном воплощении амфифильный агент представляет собой PEG илированный липид, поверхностно-активное вещество, жирную кислоту или блок-сополимер. В дополнительном воплощении амфифильный агент представляет собой поверхностно-активное вещество. В еще одном дополнительном воплощении амфифильный агент представляет собой жирную кислоту. Поверхностно-активное вещество предпочтительно является неионным. Блок-сополимер предпочтительно представляет собой PEO-PPO-PEO (полиэтиленоксид-полипропиленоксид-полиэтиленоксид) или PEO-поли(изопрен)-PEO. В еще одном дополнительном воплощении амфифильный агент представляет собой PEG илированный липид. PEG илированный липид предпочтительно содержит PEG400, PEG500, PEG1000, PEG2000, PEG3000, PEG4000 или PEG5000. Более предпочтительно, когда PEG илированный липид содержит PEG1000 или PEG2000. Предпочтительно, когда липид представляет собой холестерин. Также предпочтительно, когда липид представляет собой фосфолипид. Также предпочтительно, когда липид представляет собой дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE). Также предпочтительно, когда липид представляет собой димиристоилфосфэтаноламин (DMPE). Также предпочтительно, когда липид представляет собой дистеароилглицерин (DSG). Предпочтительно, когда PEG илированный липид представляет собой холестерин-PEG2000, DSPE-PEG1000, DSPE-PEG2000 или DSG-PEG2000.

В еще одном дополнительном воплощении заявленная фармацевтическая композиция содержит гидрофобную добавку. Гидрофобная добавка предпочтительно представляет собой углеводород, терпен или гидрофобный липид, алкиловый сложный эфир, холестерилловый сложный эфир, моно-, ди-, триалкилглицерид. Более предпочтительно, когда гидрофобная добавка представляет собой углеводород. Также более предпочтительно, когда гидрофобная добавка представляет собой терпен. Терпен предпочтительно представляет собой сквалан. Также более предпочтительно, когда гидрофобная добавка представляет собой гидрофобный липид.

В еще одном дополнительном воплощении фармацевтическая композиция содержит суспензию наночастиц в водной среде. В еще одном дополнительном воплощении фармацевтическая композиция приготовлена в виде сухого порошка.

В другом аспекте изобретения предложена сухая порошковая фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (PH) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение формулы (II).

В еще одном аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (PH) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение формулы (II) и пропеллент.

Предпочтительно любая предложенная фармацевтическая композиция находится в аэрозольной форме.

В еще одном аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения легочной

гипертензии (РН) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение формулы (II), DSPE-PEG2000 и сквалан. В еще одном аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (РН) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение формулы (II) и DSPE-PEG2000.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения легочной гипертензии (РН) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения формулы (II) или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (II). Способы лечения включают лечение РН групп I, II, III, IV или V согласно классификации WHO. В одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента. В другом воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят пациенту перорально, назально, внутривенно или подкожно. Предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием дозирующего ингалятора. Также предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием сухого порошкового ингалятора. Также предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием небулайзера. Небулайзер предпочтительно представляет собой вибрационный меш-небулайзер. В одном воплощении введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции приводит к снижению количества побочных эффектов у пациента или к снижению тяжести побочного эффекта у пациента по сравнению с количеством побочных эффектов или тяжестью побочного эффекта у пациента при введении трепростинила или илопроста. Снижение тяжести побочного эффекта предпочтительно представляет собой снижение частоты или тяжести кашлевой реакции. В одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят один раз в сутки. В другом воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят два раза в сутки. В еще одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят три или более раз в сутки.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения легочной артериальной гипертензии (РАН) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения формулы (II). В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения легочной артериальной гипертензии (РАН) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (II). Способы лечения включают лечение РАН групп I, II, III, IV или V согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA). В одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента. В другом воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят пациенту перорально, назально, внутривенно или подкожно. Предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием дозирующего ингалятора. Также предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием сухого порошкового ингалятора. Также предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием небулайзера. Небулайзер предпочтительно представляет собой вибрационный меш-небулайзер. В одном воплощении введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции приводит к снижению количества побочных эффектов у пациента или к снижению тяжести побочного эффекта у пациента по сравнению с количеством побочных эффектов или тяжестью побочного эффекта у пациента при введении трепростинила или илопроста. Снижение тяжести побочного эффекта предпочтительно представляет собой снижение тяжести кашлевой реакции. В одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят один раз в сутки. В другом воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят два раза в сутки. В еще одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят три или более раз в сутки.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения хронической тромбоэмболической легочной гипертензии у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения формулы (II) или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (II).

В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения портолегочной гипертензии (PPH) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения формулы (II). В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения портолегочной гипертензии (PPH) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (II). В одном воплощении эффективное количество соединения или композиции вводят в легкие пациента. В другом воплощении эффективное количество соединения или композиции вводят пациенту перорально, назально, внутривенно или подкожно. Предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием дозирующего ингалятора. Также предпоч-

тительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием сухого порошкового ингалятора. Также предпочтительно, когда эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием небулайзера. Небулайзер предпочтительно представляет собой вибрационный меш-небулайзер. В одном воплощении введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции приводит к снижению количества побочных эффектов у пациента или к снижению тяжести побочного эффекта у пациента по сравнению с количеством побочных эффектов или тяжестью побочного эффекта у пациента при введении трепростинила или илопроста. Снижение тяжести побочного эффекта предпочтительно представляет собой снижение тяжести кашлевой реакции. В одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят один раз в сутки. В другом воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят два раза в сутки. В еще одном воплощении эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят три или более раз в сутки.

В одном воплощении соединение или фармацевтическая композиция, введенные пациенту, нуждающемуся в лечении РН, (например РАН) или РРН, обеспечивают большее среднее значение площади под кривой (AUC_{0-t}) в легких или плазме крови для этого соединения и/или трепростинила по сравнению со средним значением площади под кривой (AUC_{0-t}) в легких или плазме крови для трепростинила, когда пациенту вводят трепростинил. В другом воплощении соединение или фармацевтическая композиция, введенные нуждающемуся в этом пациенту, обеспечивают более длительное время до достижения максимальной концентрации (t_{max}) для этого соединения в легких или плазме крови по сравнению с временем достижения максимальной концентрации (t_{max}) для трепростинила в легких или плазме крови, когда пациенту вводят трепростинил. В еще одном другом воплощении соединение или фармацевтическая композиция, введенные нуждающемуся в этом пациенту, обеспечивают больший легочный период полувыведения ($t_{1/2}$) соединения по сравнению с легочным $t_{1/2}$ трепростинила.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой график, показывающий спонтанный гидролиз соединений трепростинила в зависимости от времени (СЗ - пропиловый сложный эфир, С4 - бутиловый сложный эфир, С5 - пентилловый сложный эфир, С6 - гексилловый сложный эфир, С8 - октиловый сложный эфир и С10 - дециловый сложный эфир).

Фиг. 1В представляет собой график, показывающий эстеразаопосредованный гидролиз алкильных цепей в разные моменты времени (15, 30, 60 мин) соединений трепростинила, растворенных в водном буферном растворе, и композиций трепростинила, содержащих PEG илированные липиды.

Фиг. 2 представляет собой график зависимости среднего диаметра частиц для различных алкиловых сложных эфиров трепростинила в композициях, содержащих PEG илированные липиды, от длины цепи алкилового сложного эфира. Алкильная цепь присутствует в карбоновокислотной группировке трепростинила. PD означает полидисперсность.

Фиг. 3А, 3В и 3С представляют собой графики зависимости относительного сАМР-ответа клеток СНО-К1-Р4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от времени в ответ на композиции 10 мкМ (фиг. 3А), 1 мкМ (фиг. 3В) или 0,1 мкМ (фиг. 3С) трепростинила и алкилового сложного эфира трепростинила (С6 - гексилловый сложный эфир, С8 - октиловый сложный эфир, С10 - дециловый сложный эфир).

Фиг. 4 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток СНО-К1-Р4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от времени в ответ на композиции 5 мкМ трепростинила и алкилового сложного эфира трепростинила (С6 - гексилловый сложный эфир, С8 - октиловый сложный эфир, С10 - дециловый сложный эфир, С12 - додециловый сложный эфир).

Фиг. 5 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток СНО-К1-Р4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от времени в ответ на стимулирование трепростинилом и различными алкиловыми сложными эфирами трепростинила при 5 мкМ.

Фиг. 6 представляет собой график зависимости относительной сАМР активности клеток СНО-К1-Р4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от времени в ответ на стимулирование трепростинилом и распыляемыми и нераспыляемыми композициями алкиловых сложных эфиров трепростинила по результатам измерений модифицированным методом анализа GloSensor, "(N)" означает распыляемые композиции.

Фиг. 7 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток СНО-К1-Р4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от свободного трепростинила в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 8 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток СНО-К1-Р4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от стимулирования композицией алкилового сложного эфира трепростинила Т554 (С₂-TR) в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 9 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток СНО-К1-Р4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от стимулирования композицией алкилового сложного эфира трепростинила Т568 (С₁₂-TR) в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 10 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток СНО-К1-Р4

($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от стимулирования композицией алкилового сложного эфира трепростинила T631 (C_{14} -TR) в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 11 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1-P4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от стимулирования композицией алкилового сложного эфира трепростинила T623 (C_{16} -TR) в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 12 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1-P4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от стимулирования соединением этиловый сложный эфир трепростинила (C_2) в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 13 представляет собой график зависимости относительного сАМР ответа клеток CHO-K1-P4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от стимулирования соединением, представляющим собой этиловый сложный эфир трепростинила (C_{12}), в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 14 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1-P4 ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку) от композиций этилового сложного эфира трепростинила (C_2) в различных дозировках и в разные моменты времени.

Фиг. 15А представляет собой график зависимости легочного артериального давления (выраженного в процентах от исходного уровня гипоксии) от времени в ответ на стимулирование животных забуференным фосфатами физиологическим раствором (PBS), трепростинилом и простациклиновыми композициями (T554 (C_2) и T-568 (C_{12})). Целевая доза трепростинила и алкиловых сложных эфиров простациклина составляла 76,8 нмоль/кг; достигаемая депонированная доза может быть в 5 раз ниже, чем эти целевые значения.

Фиг. 15В представляет собой точечную диаграмму, показывающую эффект трепростинила и композиций C_2 , C_8 , C_{10} , и C_{12} алкиловых сложных эфиров трепростинила на РАР (выраженное в процентах от исходного уровня гипоксии) в *in vivo* модели РАН на крысах с острой гипоксией. Дозы представляли собой целевые значения, и фактические дозы в легких могут быть приблизительно в 5 раз ниже.

Фиг. 16 представляет собой график зависимости системного артериального давления (выраженного в процентах от исходного уровня гипоксии) от времени в ответ стимулирование животных PBS, трепростинилом и композициями алкиловых сложных эфиров трепростинила (T554 (C_2 -TR) и T-568 (C_{12} -TR)) в *in vivo* модели РАН на крысах с острой гипоксией. Вертикальной пунктирной линией отмечено изменение временных инкрементов по оси x. Целевая доза для трепростинила и алкиловых сложных эфиров простациклина составляла 76,8 нмоль/кг; достигаемая депонированная доза может быть в 5 раз ниже, чем эти целевые значения.

Фиг. 17 представляет собой график зависимости частоты сердечных сокращений *in vivo* (выраженной в процентах от исходного уровня гипоксии) от времени в ответ на стимулирование животных PBS, трепростинилом и композициями алкиловых сложных эфиров трепростинила (T554 (C_2) и T-568 (C_{12})) в *in vivo* модели РАН на крысах с острой гипоксией. Вертикальной пунктирной линией отмечено изменение временных инкрементов по оси x. Целевая доза для трепростинила и алкиловых сложных эфиров простациклина составляла 76,8 нмоль/кг; достигаемая депонированная доза может быть в 5 раз ниже, чем эти целевые значения.

Фиг. 18, верхняя панель, представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 от стимуляции 5C9-TR (композицией алкилового сложного эфира 5-нонанил-трепростинила) в различных дозировках и в разные моменты времени. Фиг. 18, нижняя панель, показывает EC_{50} 5C9-TR с течением времени, вычисленную из сАМР-ответа клеток CHO-K1 на 5C9-TR.

Фиг. 19, верхняя панель, представляет собой график относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 на стимулирование C_{14} -TR (композицией C_{14} алкилового сложного эфира трепростинила) при различных дозировках и в разные моменты времени. Фиг. 19, нижняя панель, показывает EC_{50} C_{14} -TR с течением времени, вычисленную из сАМР-ответа клеток CHO-K1 на C_{14} -TR.

Фиг. 20, верхняя панель, представляет собой график относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 на стимулирование C_{16} -TR (композицией C_{16} алкилового сложного эфира трепростинила) при различных дозировках и в разные моменты времени. Фиг. 20, нижняя панель, показывает EC_{50} C_{16} -TR с течением времени, вычисленную из сАМР-ответа клеток CHO-K1 на C_{16} -TR.

Фиг. 21 представляет собой графики зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 от времени в ответ на стимулирование C_{12} -TR, C_{14} -TR, C_{16} -TR или 3-нонанил-TR (5C9-TR) при 10 мкМ (верхняя панель) или 5 мкМ (нижняя панель).

Фиг. 22 (верхняя панель) представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 от стимуляции композицией алкилового сложного эфира трепростинила T679 (45 мол.% C_{14} -TR, 45 мол.% сквалана, 10% chol-PEG2k) в различных дозировках и в разные моменты времени. Фиг. 22 (нижняя панель) показывает EC_{50} T679 с течением времени, вычисленный из сАМР-ответа клеток CHO-K1 на T679.

Фиг. 23 представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 от времени в ответ на стимулирование трепростинилом, T631 (40 мол.% C_{14} -TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) или T679 (45 мол.% C_{14} -TR, 45 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-

PEG2k) при 10 мкМ (верхняя панель) или 5 мкМ (нижняя панель).

Фиг. 24, верхняя панель, представляет собой график зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 на стимулирование композицией алкилового сложного эфира трепростинила Т647 (90 мол.% C₁₄-TR, 10 мол.% chol-PEG2k) в различных дозировках и в разные моменты времени. Фиг. 24, нижняя панель, показывает EC₅₀ Т647 с течением времени, вычисленную из сАМР-ответов клеток CHO-K1 на Т647-TR.

Фиг. 25 представляет собой графики зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 от времени в ответ на стимулирование трепростинилом, Т631 (40 мол.% C₁₄-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) или Т647 (90 мол.% C₁₄-TR, 10 мол.% chol-PEG2k) при 10 мкМ (верхняя панель) или 5 мкМ (нижняя панель).

Фиг. 26, верхняя панель, представляет собой график зависимости относительных сАМР-ответов клеток CHO-K1 на стимулирование композицией алкилового сложного эфира трепростинила в форме липидных наночастиц Т637 (40 мол.% C₁₈-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) в различных дозировках и в разные моменты времени. Фиг. 26, нижняя панель, показывает EC₅₀ Т637 с течением времени, вычисленную из сАМР-ответов клеток CHO-K1 на Т637-TR.

Фиг. 27 представляет собой графики зависимости относительного сАМР-ответа клеток CHO-K1 от времени в ответ на стимулирование трепростинилом, Т555 (40 мол.% C₈-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), Т556 (40 мол.% C₁₀-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), Т568 (40 мол.% C₁₂-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), Т631 (40 мол.% C₁₄-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), Т623 (40 мол.% C₁₆-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) или Т637 (40 мол.% C₁₈-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) при 10 мкМ (верхняя панель) или 5 мкМ (нижняя панель).

Фиг. 28 представляет собой график степени превращения (% от общего) с течением времени (часы) для линейного простациклинового соединения (C₈-TR) в сравнении с разветвленными (2-диметил-1-пропанил-TR, 3,3-диметил-1-бутанил-TR, 2-этил-1-бутанил-TR, 5-нонанил-TR или 3-пентанил-TR) простациклиновыми соединениями.

Фиг. 29 представляет собой график, показывающий превращение соединений трепростинила, дериватизированных различными линейными алкильными цепями, относительно превращения соединения трепростинила, дериватизированного октильной группировкой (R₂=C₈). Превращение измеряли через 1 ч после инкубирования с эстеразой.

Фиг. 30 представляет собой график, показывающий превращение соединений трепростинила, дериватизированных различными разветвленными алкильными цепями, относительно превращения соединения трепростинила, дериватизированного октильной группировкой (R₂=C₈). Превращение измеряли через 1 ч после инкубирования с эстеразой.

Фиг. 31 представляет собой схематическое изображение ингаляционной системы для воздействия потоком, направленным только в нос, Jaeger-NYU (CH Technologies, Westwood, NJ, www.onares.org), использованной для 24-часового фармакокинетического исследования.

Фиг. 32, слева, представляет собой график зависимости уровней трепростинила в плазме крови (нг/мл) от времени для трепростинила и различных ингалируемых композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила. Фиг. 32, справа, представляет собой график зависимости уровней трепростинила в плазме крови (нг/мл) от времени для трепростинила и различных ингалируемых композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме мицелл.

Фиг. 33 представляет собой график концентрации трепростинила и алкиловых сложных эфиров трепростинила в легком после введения доз распыленного раствора трепростинила или суспензий алкиловых сложных эфиров трепростинила. Легкие собирали через 6 ч после введения доз. Концентрация алкилового сложного эфира трепростинила представлена как молярный эквивалент трепростинила.

Фиг. 34, вверху, представляет собой график зависимости уровней трепростинила в плазме крови (нг/мл) от времени у крыс после ингаляции только через нос распыленных композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила. Фиг. 34, внизу, представляет собой зависимость уровней трепростинила и алкиловых сложных эфиров трепростинила в плазме крови (нг/мл) от времени у крыс после ингаляции только через нос распыленных композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила.

Фиг. 35, вверху, представляет собой график зависимости уровней трепростинила в плазме крови (нг/мл) от времени после распыления различных концентраций композиций C₁₆-TR (введение доз только через нос). Фиг. 35, внизу, представляет собой график зависимости уровней трепростинила и C₁₆-TR в плазме крови (нг/мл) от времени после распыления различных концентраций композиций C₁₆-TR (введение доз только через нос).

Фиг. 36 представляет собой график зависимости концентраций трепростинила (нг/мл) в плазме крови у интубированных собак от времени после введения трепростинила или композиции в форме липидных наночастиц Т623 (40 мол.% C₁₆-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC).

Фиг. 37, слева, представляет собой график зависимости превращения алкилового сложного эфира трепростинила в трепростинил от времени для различных алкиловых сложных эфиров трепростинила,

которыми воздействовали на гомогенат ткани легкого крысы. Фиг. 37, справа, представляет собой график зависимости превращения C_{12} -трепростинила в трепростинил от времени в гомогенате ткани легкого крысы, собаки и обезьяны.

Фиг. 38 представляет собой график зависимости среднего легочного артериального давления (mPAP) от времени у крыс, которым вводили PBS, трепростинил, T568 (40 мол.% C_{12} -TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) или T623 (40 мол.% C_{16} -TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC).

Фиг. 39, сверху, представляет собой график зависимости среднего системного артериального давления (mSAP) от времени у крыс, которым вводили PBS, трепростинил, T568 или T623. Фиг. 39, внизу, представляет собой график зависимости частоты сердечных сокращений от времени у крыс, которым вводили PBS, трепростинил, T568 или T623.

Фиг. 40 представляет собой график зависимости уровней трепростинила в плазме крови (нг/мл) от времени у крыс после введения свободного трепростинила, T568 или T623.

Фиг. 41 представляет собой график зависимости уровней трепростинила в плазме крови (нг/мл) от времени у крыс после введения композиции T763.

Подробное описание изобретения

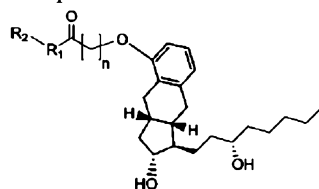
Термин "алкил", использованный в данном документе, относится как к прямоцепочечному алкилу, где длина алкильной цепи указана числовым диапазоном, так и к разветвленному алкилу, где существует точка разветвления в цепи, и общее количество атомов углерода в цепи указано числовым диапазоном. В иллюстративных воплощениях "алкил" относится к алкильной цепи, как определено выше, содержащей 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 атомов углерода (т.е. C_6 - C_{16} алкил).

Термин "алкенил", использованный в данном документе, относится к углеродной цепи, содержащей одну или более двойных углерод-углеродных связей.

Термин "арил", использованный в данном документе, относится к циклическому углеводороду, где кольцо характеризуется делокализованными π -электронами (ароматичность), равномерно распределенными между членами кольца, и где количество кольцевых атомов указано числовым диапазоном. В иллюстративных воплощениях "арил" относится к циклическому углеводороду, как описано выше, содержащему 6, 7, 8, 9 или 10 кольцевых атомов (т.е. C_6 - C_{10} арил). Примеры арильных групп включают, без ограничения, бензол, нафталин, тетралин, инден и индан.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение, представляющее собой производное трепростинила, или композиция, содержащая это соединение, которое является эффективным при употреблении в режиме введения один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки, например, для лечения легочной артериальной гипертензии или портолегочной гипертензии у нуждающегося в этом пациента. Соединение, предложенное в данном документе, в одном воплощении можно вводить менее часто, чем трепростинил, с равной или более высокой эффективностью. Более того, в одном воплощении профиль побочных эффектов соединений, предложенных в данном документе, является менее опасным, чем профиль побочных эффектов от введения трепростинила. Эти преимущества в одном воплощении обеспечивают лучшее соблюдение пациентами режима лечения. Лечение в одном воплощении происходит в результате легочного введения одного из соединений, предложенных в данном документе, например с использованием небулайзера, сухого порошкового ингалятора или дозирующего ингалятора. В некоторых воплощениях композиция, содержащая одно из соединений, предложенных в данном документе, вводят с использованием небулайзера пациенту, нуждающемуся в лечении РН. В некоторых воплощениях соединение, описанное в данном документе, суспендировано в пропелленте и доставляется в организм пациента с использованием дозирующего ингалятора.

В другом аспекте изобретения предложено соединение формулы (II)



Формула (II),

где R_1 представляет собой O ;

R_2 представляет собой тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил или октадецил; и n означает 1.

В одном воплощении предложено соединение формулы (II), где один или более атомов водорода замещены дейтерием. Соответственно в одном воплощении настоящее изобретение относится к изотопологу формулы (II), замещенному одним или более атомами дейтерия. Изотополог формулы (II) может быть использован для точного определения концентрации соединений формулы (II) в биологических жидкостях. Согласно изобретению также предложены композиции, содержащие эти дейтерированные изотопологи, и способы лечения заболеваний и состояний, как изложено в данном документе.

В одном воплощении предложенные соединения с разветвленной цепью демонстрируют более вы-

сокую растворимость и к тому же более медленное ферментативное превращение в трепростинил по сравнению с соединениями с линейной цепью. В одном воплощении предложено асимметрическое соединение с разветвленной цепью, где асимметрическое соединение с разветвленной цепью более стабильное, чем соответствующее симметрическое соединение с разветвленной цепью.

Термины "R-изомер" или "S-изомер", использованные в данном документе, относятся к энантиомерно чистому изомеру. "Энантиомерно чистый изомер" представляет собой по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% чистый R-или S- изомер или при использовании D/L номенклатуры D- или L-изомер. Рацемическое соединение представляет собой соединение, имеющее смесь в равных количествах обоих энантиомеров.

В другом аспекте изобретения описанное в данном документе соединение содержится в композиции, например, для доставки в организм пациента для лечения легочной гипертензии (PH). В одном воплощении PH представляет собой легочную артериальную гипертензию (PAH). Простациклиновые композиции (так называемые "композиции в форме липидных наночастиц") и препараты, содержащие простациклин, катионное соединение и поверхностно-активное вещество, описаны в PCT публикации WO 2014/085813, которая во всей полноте для всех целей включена в данное описание посредством ссылки. Композиции, описанные в WO 2014/085813, пригодны для использования с производными, предложенными в данном документе.

В одном воплощении композиция содержит одно из описанных в данном документе соединений формулы (II) и амфифильный агент. В одном воплощении при совместном приготовлении это соединение и амфифильный агент образуют микро- или наночастицы. В одном воплощении амфифильный агент представляет собой PEG илированный липид, поверхностно-активное вещество или блок-сополимер. В другом воплощении предложенная композиция содержит два или более описанных в данном документе соединений формулы (II), включая дейтерированные соединения, и амфифильный агент (например, PEG илированный липид, липид, поверхностно-активное вещество или блок-сополимер). В одном воплощении предложенная композиция, содержащая указанное выше соединение и амфифильный агент, при совместном приготовлении содержит множество наночастиц. В дополнительном воплощении средний диаметр этих многочисленных наночастиц составляет от примерно 20 до примерно 700 нм, например от примерно 50 до примерно 500 нм, от примерно 100 до примерно 600 нм или от примерно 100 до примерно 500 нм. Когда амфифильный агент содержит липид, например PEG илированный липид, такой как холестерин-PEG или дистеароилфосфатидилэтаноламин-PEG (DSPE-PEG), тогда композиция описана как содержащая липидные наночастицы.

В дополнительном воплощении предложенная композиция содержит соединение формулы (II) и PEG илированный липид в качестве амфифильного агента. В дополнительном воплощении PEG илированный липид содержит PEG400-PEG5000. Например, в одном воплощении PEG илированный липид содержит PEG400, PEG500, PEG1000, PEG2000, PEG3000, PEG4000 или PEG5000. В еще одном воплощении липидный компонент PEG илированного липида содержит холестерин, димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дипальмитоилфосфэтаноламин (DPPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), димиристоилглицерин (DMG), дифосфатидилглицерин (DPG) или дистеароилглицерин (DSG). В еще одном дополнительном воплощении PEG илированный липид представляет собой холестерин-PEG2000 или DSPE-PEG2000.

В зависимости от его молекулярной массы (MW) PEG также упоминается в данной области как полиэтиленоксид (PEO) или полиоксиэтилен (POE). PEG илированный липид может содержать разветвленную или неразветвленную молекулу PEG и не ограничен конкретной молекулярной массой PEG.

Например, в одном воплощении PEG илированный липид содержит молекулу PEG, имеющую молекулярную массу 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или 10000 г/моль. В одном воплощении PEG имеет молекулярную массу 1000 или 2000 г/моль.

Липидный компонент PEG илированного липида может иметь суммарный заряд (например катионный или анионный) или может быть суммарно нейтральным. Липиды, используемые в PEG илированном липидном компоненте по настоящему изобретению, могут быть синтетическими, полусинтетическими или природными липидами, включая фосфолипид, сфинголипид, гликолипид, керамид, токоферол, стерин, жирную кислоту или гликопротеин, такой как альбумин. В одном воплощении липид представляет собой стерин. В дополнительном воплощении стерин представляет собой холестерин. В другом воплощении липид представляет собой фосфолипид. Фосфолипиды включают, без ограничения, фосфатидилхолин (PC), фосфатидилглицерин (PG), фосфатидилинозит (PI), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилэтаноламин (PE) и фосфатидиновую кислоту (PA). В одном воплощении фосфолипид представляет собой яичный фосфолипид, соевый фосфолипид или гидрогенизированные яичный и соевый фосфолипиды. В одном воплощении PEG илированный липид содержит фосфолипид. В дополнительном воплощении фосфолипид содержит сложноэфирные связи жирных кислот в положениях 2 и 3 глицерина, содержащих цепи из 12-26 атомов углерода, и разные головные группы в положении 1 глицерина, которые включают холин, глицерин, инозит, серин, этаноламин, а также соответствующие фосфатидиновые кислоты. Цепи на этих жирных кислотах могут быть насыщенными или ненасыщенными, и фосфолипид может состоять

из жирных кислот с разной длиной цепи и разной степенью ненасыщенности. В частности, в одном воплощении PEG илированный липид предложенной композиции содержит дистеароилфосфоэтаноламин (DSPE), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC) димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дипальмитоилфосфоэтаноламин (DPPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), димиристоилглицерин (DMG), дифосфатидилглицерин (DPG) или дистеароилглицерин (DSG).

Другие примеры липидов для использования в раскрытых в данном документе композициях, содержащих PEG илированные липиды, включают димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG), диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) и смешанные фосфолипиды, такие как пальмитоилстеароилфосфатидилхолин (PSPC) и пальмитоилстеароилфосфатидилглицерин (PSPG), триацилглицерин, диацилглицерин, керамид, сфингозин, сфингомиелин и однократно ацилированные фосфолипиды, такие как моно-олеил-фосфатидилэтаноламин (MOPE). В другом воплощении липидная часть PEG илированного липида содержит аммониевую соль жирной кислоты, фосфолипид, глицерид, фосфолипид и глицерид, стерин (например, холестерин), фосфатидилглицерин (PG), фосфатидиновую кислоту (PA), фосфатидилхолин (PC), фосфатидилинозит (PI), фосфатидилсерин (PS) или их комбинацию. Жирная кислота в одном воплощении включает жирные кислоты с длиной углеродной цепи от 12 до 26 атомов углерода, которые являются либо насыщенными, либо ненасыщенными. Некоторые конкретные примеры включают миристиламин, пальмитиламин, лаурилам и стеарилам, дилауроилэтилфосфохолин (DLEP), димиристоилэтилфосфохолин (DMEP), дипальмитоилэтилфосфохолин (DPEP) и дистеароилэтилфосфохолин (DSEP), хлорид N-(2,3-ди-(9(Z)-октадеценилокси)-проп-1-ил-N,N,N-триметиламмония (DOTMA) и 1,2-бис-(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP). Примеры стерина для использования в композициях, предложенных в данном документе, включают холестерин и эргостерин. Примеры PG, PA, PI, PC и PS для использования в композициях, предложенных в данном документе, включают DMPG, DPPG, DSPG, DMPA, DPPA, DSPA, DMPI, DPPI, DSPI, DMPS, DPPS и DSPS, DSPC, DPPG, DMPC, DOPC, яичный PC и соевый PC.

В одном воплощении PEG илированный липид представляет собой холестерин-PEG2000, DSPE-PEG1000 или DSG-PEG2000.

В другом воплощении композиция, предложенная в данном документе, содержит соединение формулы (II) и гидрофобную добавку. В дополнительном воплощении композиция содержит амфифильный агент, например PEG илированный липид, как описано выше.

В еще одном другом воплощении два или более описанных в данном документе соединений формулы (II), амфифильный агент (например PEG илированный липид, липид, поверхностно-активное вещество или блок-сополимер) и гидрофобная добавка присутствуют в композиции.

В одном воплощении предложенная композиция содержит соединение формулы (II) и PEG илированный липид. В другом воплощении предложенная композиция содержит соединение формулы (II) и поверхностно-активное вещество. В еще одном другом воплощении предложенная композиция содержит соединение формулы (II), гидрофобную добавку и амфифильный агент. В дополнительном воплощении амфифильный агент представляет собой поверхностно-активное вещество, PEG илированный липид или блок-сополимер. В еще одном дополнительном воплощении амфифильный агент представляет собой PEG илированный липид.

В одном воплощении указанное соединение присутствует в композиции в концентрации от 5 до 99 мол.%. В дополнительном воплощении соединение присутствует в композиции в концентрации от 40 до 95 мол.%. В дополнительном воплощении соединение присутствует в композиции в концентрации от 40 до 60 мол.%. В одном воплощении соединение присутствует в композиции в концентрации от примерно 40 мол.% или примерно 45 мол.%.

Амфифильный агент, например PEG илированный липид, когда он присутствует в композиции, в одном воплощении присутствует в концентрации от 10 до 30 мол.%, например от 10 до 20 мол.% или от 15 до 25 мол.%. В еще одном дополнительном воплощении PEG илированный липид присутствует в композиции в концентрации примерно 10 или 20 мол.%.

Гидрофобная добавка, когда она присутствует в композиции, в одном воплощении присутствует в композиции в концентрации от 25 до 50 мол.%, например от 30 до 50 мол.%, от 35 до 45 мол.%. В еще одном дополнительном воплощении гидрофобная добавка присутствует в композиции в концентрации примерно 40 мол.% или примерно 45 мол.%.

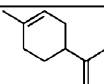
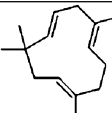
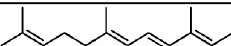
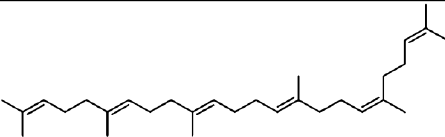
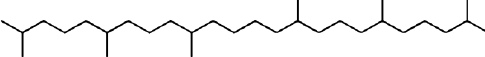
Предложенная композиция в одном воплощении содержит соединение формулы (II), как описано в данном документе, амфифильный агент и гидрофобную добавку. В одном воплощении гидрофобная добавка (например, добавка, которая является, по меньшей мере, частично гидрофобной) представляет собой углеводород, терпеновое соединение или гидрофобный липид (например токоферол, токоферола ацетат, стерин, сложный эфир стерина, алкиловый сложный эфир, ацетат витамина А, триглицерид, фосфолипид). В одном воплощении гидрофобная добавка представляет собой холестерилацетат, этилстеарат, пальмитат, мирилат, пальмитилпальмитат, токоферилацетат, моноглицерид, диглицерид, триглице-

рид типа пальмитата, миристата, додеканата, деканата, октаноата или сквалана. В одном воплощении композиция содержит соединение формулы (II), амфифильный агент и углеводород. Углеводород может представлять собой ароматический углеводород, алкан, алкен, циклоалкан или алкин. В одном воплощении углеводород представляет собой алкан (то есть насыщенный углеводород). В другом воплощении углеводород представляет собой C_{15} - C_{30} углеводород. В дополнительном воплощении углеводород представляет собой C_{15} , C_{20} , C_{25} , C_{30} , C_{35} , C_{40} , C_{45} или C_{50} углеводород. В еще одном другом воплощении гидрофобная добавка представляет собой C_{15} - C_{25} углеводород, C_{15} - C_{35} углеводород, C_{15} - C_{45} углеводород, C_{15} - C_{20} углеводород, C_{20} - C_{25} углеводород, C_{25} - C_{30} углеводород, C_{30} - C_{35} углеводород, C_{35} - C_{40} углеводород, C_{40} - C_{45} углеводород или C_{45} - C_{50} углеводород.

В одном воплощении предложена композиция, содержащая указанное соединение, амфифильный агент и терпеновое соединение (например, гидрофобную добавку). Композиция в дополнительном воплощении содержит PEG илированный липид в качестве амфифильного агента. Однако, как указано выше, блок-сополимеры, а также поверхностно-активные вещества могут быть использованы в качестве амфифильного компонента композиции. Терпеновое соединение (гидрофобная добавка) в одном воплощении представляет собой углеводород (например, изопрен, сквалан или сквален). В другом воплощении терпеновое соединение представляет собой гемитерпен (C_5H_8), монотерпен ($C_{10}H_{16}$), сесквитерпен ($C_{15}H_{24}$), дитерпен ($C_{20}H_{32}$) (например кафестол, кахвеол, кембрен, таксадиен), сестертерпен ($C_{25}H_{40}$), тритерпен ($C_{30}H_{48}$), сескватерпен ($C_{35}H_{56}$), тетратерпен ($C_{40}H_{64}$), политерпен (например, полиизопрен с транс двойными связями) или норизопrenoид (например, 3-оксо- α -ионол, производные 7,8-дигидроионона). Терпеновое соединение в другом воплощении выбрано из соединений, указанных в табл. 1 ниже. В одном воплощении гидрофобная добавка представляет собой сквалан.

Таблица 1

Терпеновые гидрофобные добавки, пригодные для использования
в композициях по настоящему изобретению

Название	Формула
Изопрен	
Лимонен	
Гумулен	
Фарназен	
Сквален	
Сквалан	

Как изложено выше, композиция, предложенная в данном документе, в одном воплощении содержит соединение и один или более PEG илированных липидов. В дополнительном воплощении композиция содержит гидрофобную добавку, которая описана выше. В одном воплощении композиция, предложенная в данном документе, содержит соединение формулы (II), гидрофобную добавку и PEG илированный липид. В дополнительном воплощении гидрофобная добавка содержит углеводород, например терпеновое соединение.

В одном воплощении композиция на основе производного трепростинила, предложенная в данном документе, содержит компоненты, указанные в табл. С ниже.

Таблица С

Репрезентативные и сравнительные композиции трепростинила

Композиция №	<u>Соединение трепростинила</u>	<u>Гидрофобная добавка</u>	<u>Амфифильный агент</u>	<u>Дополнительный липид</u>
1	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2	Терпен	РЕГирированный	отсутствует
	представляет собой линейный C_6-C_{16}		липид	
2	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный C_6-C_{16}	Терпен	РЕГирированный липид	DOPC
3	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный C_6-C_{16}	Сквалан	Chol-PEG2k	отсутствует
4	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный C_6-C_{16}	Сквалан	DSPE-PEG2k	отсутствует
5	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный $C_{10}-C_{16}$	Терпен	РЕГирированный липид	отсутствует
6	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный $C_{10}-C_{16}$	Терпен	РЕГирированный липид	DOPC
7	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный $C_{10}-C_{16}$	Сквалан	Chol-PEG2k	отсутствует
8	Формула (II) где R_1	Сквалан	DSPE-PEG2k	отсутствует
	представляет собой O , R_2 is линейный $C_{10}-C_{16}$			
9	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный $C_{12}-C_{16}$	Терпен	РЕГирированный липид	отсутствует
10	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный $C_{12}-C_{16}$	Терпен	РЕГирированный липид	DOPC
11	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный $C_{12}-C_{16}$	Сквалан	Chol-PEG2k	отсутствует
12	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой линейный $C_{12}-C_{16}$	Сквалан	DSPE-PEG2k	отсутствует
13	Формула (II) где R_1 представляет собой O , R_2 is разветвленный C_6-C_{16}	Терпен	РЕГирированный липид	отсутствует
14	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2 представляет собой разветвленный C_6-C_{16}	Терпен	РЕГирированный липид	DOPC
15	Формула (II), где R_1 представляет собой O , R_2	Сквалан	Chol-PEG2k	отсутствует

	представляет собой разветвленный C ₆ -C ₁₆			
16	Формула (II), где R ₁ представляет собой O, R ₂ представляет собой разветвленный C ₆ -C ₁₆	Сквалан	DSPE-PEG2k	отсутствует
17 сравни- те. компози- ция	Формула (II), где R ₁ представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₆	Терпен	РЕГириро- ванный липид	отсутствует
18 сравни- те. компози- ция	Формула (II), где R ₁ представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₆	Терпен	РЕГириро- ванный липид	DOPC
19 сравни- те. компози- ция	Формула (II), где R ₁ представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₆	Сквалан	Chol-PEG2k	Отсутствует
20 сравни- те. компози- ция	Формула (II), где R ₁ представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₆	Сквалан	DSPE-PEG2k	Отсутствует
21 сравни- те. компози- ция	Формула (II), где R ₁ представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₀	Терпен	РЕГириро- ванный липид	Отсутствует
22	Формула (II), где R ₁	Терпен	РЕГириро-	DOPC
Компози- ция №	<u>Соединение трепростнилла</u>	<u>Гидрофоб- ная добавка</u>	<u>Амфифиль- ный агент</u>	<u>Дополни- тельный липид</u>
сравни- те. компози- ция	представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₀		ванный липид	
23 сравни- те. компози- ция	Формула (II), где R ₁ представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₀	Сквалан	Chol-PEG2k	Отсутствует
24 сравни- те. компози- ция	Формула (II), где R ₁ представляет собой N, R ₂ представляет собой линейный C ₆ -C ₁₀	Сквалан	DSPE-PEG2k	Отсутствует

Согласно настоящему изобретению предложены также способы лечения нуждающегося в этом пациента одним из соединений или одной из композиций, описанных в данном документе.

В одном аспекте предложен способ лечения легочной гипертензии (РН). Данный способ включает в одном воплощении введение нуждающемуся в этом пациенту соединения или композиции, представленных в данном документе. Введение в одном воплощении представляет собой легочное введение и может быть осуществлено, например, с использованием дозирующего ингалятора (MDI), сухого порошкового ингалятора (DPI) или небулайзера. Всемирная организация здравоохранения (WHO) классифицировала РН, установив пять групп. Согласно WHO группа IРН включает в себя легочную артериальную гипертензию (РАН), идиопатическую легочную артериальную гипертензию (ИРАН), семейную легочную артериальную гипертензию (ФРАН) и легочную артериальную гипертензию, связанную с другими заболеваниями (АРАН). Например, легочная артериальная гипертензия, связанная с коллагеновым заболеванием сосудов (например, склеродермой), врожденными шунтами между системным и легочным кровообращением, портальной гипертензией и/или ВИЧ-инфекцией, включены в группу I РН. Представленные в данном документе способы в одном воплощении предусмотрены для лечения пациента с РН группы I согласно классификации WHO, нуждающегося в таком лечении, например РАН-пациента, ИРАН-пациента, ФРАН-пациента или АРАН-пациента. Согласно классификации WHO группа II РН включает в себя легочную гипертензию, связанную с заболеванием левых отделов сердца, например атриальным или венткулярным заболеванием, или вальвулярным заболеванием (например, митральным стенозом). Представленные в данном документе способы в одном воплощении предусмотрены для лечения пациента группы II согласно классификации WHO, нуждающегося в таком лечении. Согласно классификации WHO группа III легочной гипертензии характеризуется как легочная гипертензия, связанная с заболева-

ниями легких, например хронической обструктивной болезнью легких (COPD), интерстициальным заболеванием легких (ILD) и/или гипоксемией. Представленные в данном документе способы в одном воплощении предусмотрены для лечения пациента группы III согласно классификации WHO, нуждающегося в таком лечении. Легочная гипертензия группы IV согласно классификации WHO представляет собой легочную гипертензию вследствие хронического тромботического и/или эмболического заболевания. К группе IV PH также отнесена хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия. У пациентов с PH группы IV заблокированы или сужены кровеносные сосуды из-за сгустков крови. Представленные в данном документе способы в одном воплощении предусмотрены для лечения пациента группы IV согласно классификации WHO, нуждающегося в таком лечении. WHO относит группу V PH к категории "смешанные", и она включает в себя PH, вызванные болезнями крови (например, истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией), системными расстройствами (например, саркоидозом, васкулитом) и/или метаболическими расстройствами (например, заболеванием щитовидной железы, гликогенозом). Представленные в данном документе способы в одном воплощении предусмотрены для лечения пациента группы V согласно классификации WHO, нуждающегося в таком лечении.

Предложенные способы могут быть использованы для лечения пациента с PH групп I (т.е. легочной артериальной гипертензии или PAH), II, III, IV или V согласно классификации WHO. В одном воплощении способа лечения PH предложен способ лечения легочной артериальной гипертензии (PAH). В другом воплощении предложен способ лечения пациента с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией. В одном воплощении способ лечения PH (например, PAH) включает введение эффективного количества одного из соединений, описанных в данном документе, легочным путем введения (ингаляцией, например, посредством MDI, или небулайзера, или сухого порошкового ингалятора), подкожным, пероральным, назальным или внутривенным путем введения нуждающемуся в этом пациенту. В одном воплощении введение осуществляют ингаляцией посредством MDI или небулайзера. В одном воплощении, где соединение доставляют с использованием небулайзера, соединение предоставляют пациенту в виде композиции, например в виде композиции в форме липидных наночастиц, как описано выше.

В другом воплощении предложен способ лечения портолегочной гипертензии (PPH). В одном воплощении этот способ включает введение эффективного количества одного из соединений, описанных в данном документе, легочным (ингаляция), подкожным, пероральным, назальным или внутривенным путем введения нуждающемуся в этом пациенту. В одном воплощении введение осуществляют ингаляцией посредством MDI или небулайзера. В одном воплощении, где соединение доставляют с использованием небулайзера, соединение предоставляют пациенту в виде композиции в форме липидных наночастиц, как описано выше.

Способы введения трепростинила и его аналогов для лечения легочной гипертензии описаны в патентах США №№ 5153222, 6521212, 7544713 и в публикации заявки на патент США № 2010/0076083, описания которых во всей их полноте для всех целей включены в данный документ посредством ссылки.

Способ лечения пациента с PH (например, PAH) или PPH включает в одном воплощении введение нуждающемуся в этом пациенту одного из соединений или композиций, представленных в данном документе, например соединения формулы (II) или композиции, содержащей соединение формулы (II). В одном воплощении способ лечения PH (например, PAH) или PPH включает введение нуждающемуся в этом лечении пациенту одного из соединений или композиций, представленных в данном документе, например соединения формулы (II) или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). Пути введения пациенту включают легочное (ингаляция), подкожное, пероральное, назальное и внутривенное введение. В одном воплощении введение соединения формулы (II) осуществляют ингаляцией посредством MDI или небулайзера. В одном воплощении, где соединение доставляют с использованием небулайзера, соединение предоставляют пациенту в виде композиции, например в виде композиции в форме липидных наночастиц, как описано выше.

В одном воплощении способ лечения PH, PAH или PPH включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения или композиции, описанных в данном документе. В дополнительном воплощении соединение вводят пациенту легочным (ингаляция), подкожным, пероральным, назальным или внутривенным путем введения. В дополнительном воплощении введение осуществляют ингаляцией, и соединение или композицию вводят с использованием небулайзера, сухого порошкового ингалятора или MDI. В еще одном дополнительном воплощении композиция содержит соединение формулы (II) или дейтерированный вариант этого соединения.

В одном воплощении введение эффективного количества соединения или композиции по настоящему изобретению для лечения PH, PAH или PPH ингаляцией, пероральным, назальным, подкожным или внутривенным введением приводит к уменьшению количества побочных эффектов или снижению тяжести одного или более побочных эффектов (упоминаемых также как "нежелательные явления") по сравнению с введением эффективного количества трепростинила, когда эффективное количество трепростинила вводят ингаляцией, пероральным, назальным, подкожным или внутривенным введением. Например, в одном воплощении пациент с PH, PAH или PPH испытывает снижение тяжести и/или частоты кашля или снижение кашлевой реакции при введении соединения или композиции по изобретению инга-

ляцией (например, с использованием небулайзера, сухого порошкового ингалятора или с использованием дозирующего ингалятора) по сравнению с тяжестью и/или частотой кашля или кашлевой реакции, вызываемых ингаляционным введением пациенту трепростинила.

В другом воплощении пероральное, назальное, внутривенное, подкожное или ингаляционное введение эффективного количества соединения или композиции по изобретению по сравнению с пероральным, назальным, подкожным, внутривенным или ингаляционным введением трепростинила приводит к снижению тяжести одного или более следующих нежелательных явлений или к уменьшению проявления одного или более следующих нежелательных явлений: головная боль, раздражение/фаринголарингеальная боль в горле, тошнота, прилив крови к лицу и/или потеря сознания.

В другом воплощении пероральное, назальное, внутривенное, подкожное или ингаляционное введение эффективного количества соединения или композиции по изобретению для лечения РН, РАН или РРН по сравнению с пероральным, назальным, подкожным, внутривенным или ингаляционным введением трепростинила приводит к снижению тяжести системных нежелательных явлений или к уменьшению проявления системного нежелательного явления.

Без какой-либо связи с теорией считается, что улучшение профиля нежелательных явлений соединений или композиций по изобретению по сравнению с трепростинилом приводит к улучшению соблюдения пациентами режима лечения.

В одном воплощении соединения или композиции по настоящему изобретению вводят реже по сравнению с разрешенными к применению в настоящее время средствами для лечения РН, РАН (например, Tyvaso®, Remodulin®) или РРН, и при этом все же достигается, по существу, эквивалентный или лучший терапевтический ответ. Пути введения пациенту включают легочное (ингаляция), подкожное, пероральное, назальное и внутривенное введение. Терапевтический ответ пациента в одном воплощении заключается в снижении индекса легочной васкулярной резистентности (PVRI) по сравнению с показателем до лечения, в снижении среднего легочного артериального давления по сравнению с показателем до лечения, увеличении показателя гипоксемии по сравнению с показателем до лечения, снижении индекса оксигенации по сравнению с показателями до лечения, улучшении функции правых отделов сердца по сравнению с показателями до лечения или улучшении способности переносить физическую нагрузку (например, при измерении в тесте шестиминутной ходьбы) по сравнению с показателями до лечения. Терапевтический ответ в одном воплощении представляет собой улучшение по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50% по сравнению с показателями до лечения. В другом воплощении терапевтический ответ представляет собой улучшение от примерно на 10 до примерно на 70%, от примерно на 10 до примерно на 60%, от примерно на 10 до примерно на 50%, от примерно на 10 до примерно на 40%, от примерно на 10 до примерно на 30%, от примерно на 10 до примерно на 20%, от примерно на 20 до примерно на 70%, от примерно на 20 до примерно на 60% или от примерно на 10 до примерно на 50% по сравнению с уровнями до лечения.

Без какой-либо связи с теорией менее частое введение соединений и композиций по изобретению обеспечивает улучшение соблюдения пациентами режима лечения по сравнению с соблюдением режима лечения пациентами, которым вводят другое средство для лечения РН, РАН или РРН (например, трепростинил - Tyvaso®, Remodulin®).

В одном воплощении композицию или соединение по настоящему изобретению вводят с использованием дозирующего ингалятора (MDI) пациенту, нуждающемуся в лечении РН, РАН или РРН. Композицию или соединение в одном воплощении доставляют посредством MDI за счет использования пропеллента, например хлорфторуглерода (CFC) или фторуглерода. В одном воплощении, где доставку осуществляют посредством MDI, соединение приготовлено не в виде композиции в форме липидных наночастиц, а суспендировано или растворено непосредственно в растворе пропеллента. В одном воплощении пациенту вводят соединение или композицию по изобретению один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В одном воплощении введение осуществляют по время приема пищи. В одном воплощении каждое введение включает введение от 1 до 5 доз (пшиков) из MDI, например 1 дозы (1 пшик), 2 доз (2 пшика), 3 доз (3 пшика), 4 доз (4 пшика) или 5 доз (5 пшиков). В одном воплощении MDI является небольшим и переносным.

В другом воплощении соединение или композицию вводят с использованием небулайзера пациенту, нуждающемуся в лечении РН, РАН или РРН. Введение осуществляют в одном воплощении один раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки или один раз через день.

В одном воплощении композицию или соединение по настоящему изобретению вводят с использованием сухого порошкового ингалятора (DPI) пациенту, нуждающемуся в лечении РН, РАН или РРН. В одном воплощении пациенту вводят соединение или композицию по изобретению один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В одном воплощении введение осуществляют во время приема пищи. В одном воплощении каждое введение включает введение от 1 до 5 доз (пшиков) из DPI, например 1 дозу (1 пшик), 2 дозы (2 пшика), 3 дозы (3 пшика), 4 дозы (4 пшика) или 5 доз (5 пшиков). В одном воплощении DPI является небольшим и переносным.

В другом воплощении соединение, введенное пациенту, нуждающемуся в этом, легочным путем с использованием способов лечения РН, РАН или РРН, описанных в данном документе, обеспечивает более длительный легочный период полувыведения ($t_{1/2}$) этого соединения или его метаболита трепростинила по сравнению с легочным периодом полувыведения ($t_{1/2}$) трепростинила, когда трепростинил вводят легочным путем (например небулайзером, сухим порошковым ингалятором или дозирующим ингалятором) пациенту, нуждающемуся в лечении РН, РАН или РРН.

В другом воплощении соединение, введенное пациенту, нуждающемуся в этом, способами лечения РН, РАН или РРН, описанными в данном документе, обеспечивает более длительный системный период полувыведения ($t_{1/2}$) этого соединения или его метаболита трепростинила по сравнению с системным периодом полувыведения ($t_{1/2}$) трепростинила, когда пациенту вводят трепростинил. В дополнительном воплощении введение соединения и трепростинила включает пероральное, назальное, подкожное или внутривенное введение.

В другом воплощении соединение, введенное пациенту, нуждающемуся в этом, способами лечения РН, РАН или РРН, обеспечивает более высокую среднюю $C_{\max}$ трепростинила в легких и/или более низкую $C_{\max}$ трепростинила в плазме крови пациента по сравнению с соответственной $C_{\max}$ трепростинила в легких или плазме крови, когда пациенту вводят трепростинил. В дополнительном воплощении введение соединения и трепростинила включает внутривенное введение.

В другом воплощении соединение, введенное пациенту, нуждающемуся в этом, способами лечения РН, РАН или РРН, обеспечивает большую среднюю площадь под кривой (AUC_{0-t}) для этого соединения или его метаболита трепростинила в легких или плазме крови по сравнению со средней площадью под кривой (AUC_{0-t}) для трепростинила в легких и плазме крови, когда пациенту вводят трепростинил. В еще одном другом воплощении соединение, введенное пациенту, нуждающемуся в этом, обеспечивает большее время до достижения максимальной концентрации ($t_{\max}$) трепростинила в легких или плазме крови по сравнению с временем до достижения максимальной концентрации ($t_{\max}$) трепростинила в легких или плазме крови, когда пациенту вводят трепростинил.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения иного заболевания, расстройства или состояния, чем РН, РАН или РРН. В патенте США № 5153222, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки, раскрыто применение трепростинила для лечения легочной гипертензии. Трепростинил разрешен для внутривенного, а также для подкожного пути введения, причем последний исключает потенциальные септические явления, связанные с использованием постоянных катетеров для внутривенного введения. В патентах США №№ 6521212 и 6756033, каждый из которых во всей полноте включен в данное описание посредством ссылки, описано введение трепростинила ингаляцией для лечения легочной гипертензии, заболевания периферических сосудов и других заболеваний и состояний. В патенте США № 6803386, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки, раскрыто введение трепростинила для лечения рака, такого как рак легкого, печени, головного мозга, поджелудочной железы, почки, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки и рака в области головы и шеи. В публикации заявки на патент США № 2005/0165111, включенной во всей ее полноте в данное описание посредством ссылки, раскрыто лечение трепростинилом ишемических повреждений. В патенте США № 7199157, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки, раскрыто, что лечение трепростинилом улучшает функции почек. В патенте США № 7879909, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки, раскрыто лечение трепростинилом неврологических язв на ногах. В публикации заявки на патент США № 2008/0280986, включенной во всей ее полноте в данное описание посредством ссылки, раскрыто лечение трепростинилом легочного фиброза, интерстициального заболевания легких и астмы. В патенте США № 6054486, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки, раскрыто лечение трепростинилом заболевания периферических сосудов. В публикации заявки на патент США № 2009/0036465, включенной во всей ее полноте в данное описание посредством ссылки, раскрыты комбинированные терапевтические средства, содержащие трепростинил. В публикации заявки на патент США № 2008/0200449, включенной во всей ее полноте в данное описание посредством ссылки, раскрыта доставка трепростинила с использованием дозирующего ингалятора. В патентах США №№ 7417070, 7384978 и 7544713, а также в публикациях заявок на патент США №№ 2007/0078095, 2005/0282901 и 2008/0249167, полное содержание каждого(ой) из которых включено в данное описание посредством ссылки, описаны пероральные композиции трепростинила и других аналогов простациклина, а также их применение для лечения различных состояний. В публикации заявки на патент США № 2012/0004307, включенной во всей ее полноте в данное описание посредством ссылки, раскрыто применение перорально вводимого трепростинила для лечения феномена Рейно, системного склероза и пальцевых ишемических повреждений. Каждое показание, указанное выше, можно лечить соединениями и композициями, представленными в данном документе. Пути введения пациенту, нуждающемуся в лечении, включают легочное (ингаляция), подкожное, пероральное, назальное и внутривенное введение.

Дополнительно следующие источники информации во всей их полноте и для всех целей включены в данное описание посредством ссылки для практического осуществления воплощений настоящего изобретения: J. Org. Chem. 2004, 69, 1890-1902, Drug of the Future, 2001, 26(4), 364-374, патенты США №№

5153222, 6054486, 6521212, 6756033, 6803386 и 7199157, публикации заявок на патент США №№ 2005/0165111, 2005/0282903, 2008/0200449, 2008/0280986, 2009/0036465 и 2012/0010159.

В одном воплощении предложен способ лечения у нуждающегося в этом пациента застойной сердечной недостаточности, заболевания периферических сосудов, астмы, тяжелой перемежающейся хромоты, иммуносупрессии, пролиферативных заболеваний, например рака, такого как рак легкого, печени, головного мозга, поджелудочной железы, почки, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки и рака в области головы и шеи, ишемических повреждений, невропатических язв на ногах и легочного фиброза, расстройства функции почек и/или интерстициального заболевания легких. В одном воплощении данный способ включает введение пациенту эффективного количества одного из соединений или композиций, представленных в данном документе, например соединения формулы (II) или его дейтерированного варианта, или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). В одном воплощении введение осуществляют ингаляцией (например, с использованием небулайзера или дозирующего ингалятора), подкожным, пероральным, назальным или внутривенным введением. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может содержать один или более активных ингредиентов в дополнение к трепростинилу моногидрату.

В одном воплощении предложен способ лечения и/или предупреждения интерстициального заболевания легких (например, легочного фиброза), или астмы, или состояния, связанного с интерстициальным заболеванием легких или астмой, у нуждающегося в этом пациента. В дополнительном воплощении данный способ включает введение пациенту эффективного количества одного из соединений или композиций, представленных в данном документе, например соединения формулы (II) или его дейтерированного варианта, или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). В одном воплощении композицию или соединение доставляют посредством MDI с использованием пропеллента, например хлорфторуглерода (CFC) или фторуглерода. Пациенту в одном воплощении вводят соединение или композицию по изобретению один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В одном воплощении введение осуществляют во время приема пищи. В одном воплощении каждое введение включает введение от 1 до 5 доз (пшиков) из MDI, например 1 дозы (1 пшик), 2 доз (2 пшика), 3 доз (3 пшика), 4 доз (4 пшика) или 5 доз (5 пшиков). MDI в одном воплощении является небольшим и переносным. В другом воплощении введение представляет собой пероральное, назальное, подкожное или внутривенное введение. В другом воплощении пероральное, назальное, внутривенное, подкожное или ингаляционное введение эффективного количества соединения или композиции по изобретению для лечения интерстициального заболевания легких (например, легочного фиброза), или астмы, или состояния, связанного с интерстициальным заболеванием легких или астмы, по сравнению с пероральным, назальным, подкожным, внутривенным или ингаляционным введением трепростинила приводит к снижению тяжести системных нежелательных явлений или к уменьшению проявления системного нежелательного явления.

В одном воплощении предложен способ лечения ишемического заболевания или состояния, такого как склеродермия, включая системный склероз или феномен Рейно, у нуждающегося в этом пациента. В дополнительном воплощении данный способ включает введение пациенту эффективного количества одного из соединений или одной из композиций, представленных в данном документе, например соединения формулы (II) или его дейтерированного варианта, или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). В одном воплощении введение осуществляют ингаляцией (например, с использованием небулайзера или дозирующего ингалятора), пероральным, назальным, подкожным или внутривенным введением. В другом воплощении пероральное, назальное, внутривенное, подкожное или ингаляционное введение эффективного количества соединения или композиции по изобретению для лечения ишемической болезни или состояния, такого как склеродермия, включая системный склероз или феномен Рейно, по сравнению с пероральным, назальным, подкожным, внутривенным или ингаляционным введением трепростинила приводит к снижению тяжести системных нежелательных явлений или к уменьшению проявления системного нежелательного явления.

Соединения или композиции, предложенные в данном документе, например соединение формулы (II), или его дейтерированный вариант, или композицию, содержащую соединение формулы (II), или композицию, содержащую дейтерированное соединение формулы (II), в одном воплощении используют для лечения у пациента пальцевого ишемического повреждения, такого как язвы или некротическое повреждение пальца, или для ослабления симптома или функционального дефицита, и/или для снижения количества симптомов и/или функциональных дефицитов, связанных с пальцевым ишемическим повреждением. Термин "пальцевое ишемическое повреждение" относится к повреждению на пальце, то есть на пальце ноги или пальце руки субъекта, такого как человеческое существо. В одном воплощении пальцевое ишемическое повреждение может быть вызвано или связано с ишемическим заболеванием или состоянием, таким как склеродермия, включая системный склероз или феномен Рейно. Симптомом, который может быть облегчен и/или ослаблен, может быть, например, боль, связанная с пальцевой ишемической язвой и/или склеродермией. В некоторых воплощениях введение соединения или композиции,

представленных в данном документе, при введении пациенту, нуждающемуся в лечении, обеспечивает ослабление или снижение одного или более функциональных дефицитов, связанных с пальцевым ишемическим повреждением. Например, в одном воплощении соединение или композиция, представленные в данном документе, ослабляет или снижает недостаточность функции руки, т.е. обеспечивает улучшение функции руки пациента, прошедшего лечение. Введение в одном воплощении представляет собой ингаляционное (например, с использованием небулайзера или дозирующего ингалятора), пероральное, назальное, подкожное или внутривенное введение. В другом воплощении пероральное, назальное внутривенное, подкожное или ингаляционное введение эффективного количества соединения или композиции по изобретению для лечения пальцевых ишемических повреждений по сравнению с пероральным, назальным, подкожным, внутривенным или ингаляционным введением трепростинила приводит к снижению тяжести системных нежелательных явлений или к уменьшению проявления системного нежелательного явления.

В одном воплощении предложен способ улучшения функции почек или лечения симптомов, связанных с дисфункцией почек или почечной недостаточностью у нуждающегося в этом пациента. В дополнительном воплощении этот способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества предложенных соединения или композиции, например соединения формулы (II), или его дейтерированного варианта, или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). Конкретные симптомы, связанные с пониженными функциями почек, включают, например, аномально низкое мочеиспускание, повышенные уровни в крови креатинина и азота мочевины, белок в моче и/или боль. Введение в одном воплощении представляет собой ингаляционное (например, с использованием небулайзера или дозирующего ингалятора), пероральное, назальное, подкожное или внутривенное введение. В другом воплощении пероральное, назальное, внутривенное, подкожное или ингаляционное введение эффективного количества соединения или композиции по изобретению для улучшения функций почек или ослабления симптомов, связанных с дисфункцией почек или почечной недостаточностью, по сравнению с пероральным, назальным, внутривенным, подкожным или ингаляционным введением трепростинила приводит к снижению тяжести системных нежелательных явлений или к уменьшению проявления системного нежелательного явления.

В одном воплощении предложен способ лечения сердечно-сосудистого заболевания, включая застойную сердечную недостаточность. Этот способ в одном воплощении включает введение нуждающемуся в этом пациенту предложенных соединения или композиции, например соединения формулы (II), или его дейтерированного варианта, или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). Введение в одном воплощении представляет собой ингаляционное (например, с использованием небулайзера или дозирующего ингалятора), пероральное, назальное, подкожное или внутривенное введение.

В одном воплощении предложен способ лечения заболевания периферических сосудов, включая окклюзионное заболевание периферической артерии и перемежающуюся хромоту. В одном воплощении этот способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту соединения или композиции, например соединения формулы (II), или его дейтерированного варианта, или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). В дополнение к предложенным соединениям и композициям в композициях по настоящему изобретению могут присутствовать другие фармакологически активные вещества, которые известны как полезные для лечения заболевания периферических сосудов. Например, соединения по изобретению могут присутствовать в комбинации с тренталом, веществом, известным как повышающее деформируемость красных кровяных клеток. Введение в одном воплощении представляет собой ингаляционное (например, с использованием небулайзера или дозирующего ингалятора), пероральное, назальное, подкожное или внутривенное введение.

В одном воплощении предложен способ лечения и/или предупреждения невропатической диабетической язвы ноги. В одном воплощении этот способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту предложенных соединения или композиции, например соединения формулы (II), или его дейтерированного варианта, или композиции, содержащей соединение формулы (II), или композиции, содержащей дейтерированное соединение формулы (II). Введение в одном воплощении осуществляют ингаляцией (например, с использованием небулайзера или дозирующего ингалятора), подкожным, пероральным, назальным или внутривенным введением. В дополнение к предложенным соединениям и композициям в композициях по настоящему изобретению могут присутствовать другие фармакологически активные вещества, которые известны как полезные для лечения и/или предупреждения пациентов с диабетической невропатией. Например, соединения по изобретению может присутствовать в комбинации с анальгетиками для лечения боли, заменами повязок, сосудорасширяющими средствами и местными или пероральными антибиотиками.

В одном воплощении введение эффективного количества соединения или композиции по настоящему изобретению для лечения различных заболеваний и показаний, описанных в данном документе, ингаляционным, подкожным, пероральным, назальным или внутривенным введением приводит к уменьшению количества побочных эффектов или снижению тяжести одного или более побочных эффек-

тов (также упоминаемых как "нежелательные явления") по сравнению с введением эффективного количества трепростинила, когда эффективное количество трепростинила вводят ингаляцией, подкожным, пероральным, назальным или внутривенным введением. Например, в одном воплощении пациент, которого лечили способами, предложенными в данном документе, ощущает снижение тяжести и/или частоты кашля или снижение кашлевой реакции при введении соединения или композиции по изобретению ингаляцией (например, с использованием небулайзера, сухого порошкового ингалятора или с использованием дозирующего ингалятора) по сравнению с тяжестью и/или частотой кашля или кашлевой реакции, вызываемой ингаляционным введением пациенту трепростинила.

В другом воплощении соединение, введенное нуждающемуся в этом пациенту, обеспечивает более высокую среднюю легочную $C_{\max}$ и/или более низкую $C_{\max}$ в плазме крови трепростинила у пациента по сравнению с соответственной $C_{\max}$ в легких или плазме крови трепростинила при введении трепростинила. В дополнительном воплощении введение соединения и трепростинила включает внутривенное введение.

В другом воплощении соединение, введенное нуждающемуся в этом пациенту, обеспечивает большую среднюю площадь под кривой (AUC_{0-t}) для этого соединения в легких или плазме крови или его метаболита трепростинила по сравнению со средней площадью под кривой (AUC_{0-t}) для трепростинила в легких или плазме крови при введении пациенту трепростинила. В еще одном другом воплощении соединение, введенное нуждающемуся в этом пациенту, обеспечивает большее время до достижения максимальной концентрации ($t_{\max}$) трепростинила в легких или плазме крови по сравнению с временем до достижения максимальной концентрации ($t_{\max}$) трепростинила в легких или плазме крови при введении пациенту трепростинила.

В одном воплощении предложенные соединение или композицию, например соединение формулы (II), или его дейтерированный вариант, или композицию, содержащую соединение формулы (II) или его дейтерированный вариант, вводят в комбинации с одним или более дополнительными активными агентами. В некоторых воплощениях такие один или более дополнительных активных агентов можно вводить также вместе с предложенным соединением или композицией, используя дозирующий ингалятор. В одном воплощении такие один или более дополнительных активных агентов можно вводить по отдельности, т.е. до или после соединения или композиции, представленных в данном документе. Конкретные дополнительные активные агенты, которые можно вводить в комбинации с трепростинилом, могут зависеть от конкретного заболевания или состояния, для лечения или предупреждения которого вводят трепростинил. В некоторых случаях дополнительный активный агент может представлять собой сердечно-сосудистый агент, такой как ингибитор COX-2 (циклооксигеназы-2), ингибитор rho-киназы, блокатор кальциевых каналов, ингибитор фосфодиэстеразы, эндотелиальный антагонист или антитромбоцитарный агент.

Как указано выше, соединения и композиции по настоящему изобретению можно доставлять в организм пациента, нуждающегося в этом, пероральным, назальным, легочным, внутривенным или подкожным путем. В отношении легочного пути соединения и композиции по настоящему изобретению можно использовать в любом дозирующем устройстве, пригодном для такого введения. Это устройство в одном воплощении сконструировано для установления оптимальной точности отмеривания и совместимости его конструктивных элементов, таких как контейнер, клапан и исполнительный механизм, с композицией и может быть основано на механической насосной системе, например системе дозирующего небулайзера, сухого порошкового ингалятора, ингалятора легкого тумана или небулайзера. Например, устройства для легочной доставки включают струйный небулайзер, электронный небулайзер, ингалятор легкого тумана и капсульный сухой порошковый ингалятор.

Подходящие пропелленты, например, для доставки посредством MDI, могут быть выбраны из таких газов, как фторуглероды, хлорфторуглероды (CFC), углеводороды, гидрофторалкановые пропелленты (например, HFA-134a и HFA-227), азот и диоксид азота или их смеси.

Устройство для ингаляционной доставки может представлять собой небулайзер, сухой порошковый ингалятор, или дозирующий ингалятор (MDI), или любое другое подходящее устройство для ингаляционной доставки, известное специалисту в данной области. Устройство может содержать однократную дозу композиции и быть использовано для доставки однократной дозы композиции или устройство может содержать многократные дозы композиции по настоящему изобретению и быть использовано для доставки многократных доз композиции по настоящему изобретению.

Устройство для ингаляционной доставки типа небулайзера может содержать композиции по настоящему изобретению в виде раствора, обычно водного, или суспензии. Например, соединение или композиция может быть суспендировано(а) в физиологическом растворе и загружено(а) в устройстве для ингаляционной доставки. Для генерирования распыленного спрея композиций для ингаляции устройство для доставки типа небулайзера может приводиться в действие ультразвуком, сжатым воздухом, другими газами, электронно или механически (например, вибрирующая сетка (меш) или пластинка с множеством отверстий). Вибрационные меш-небулайзеры генерируют тонкодисперсный, низкоскоростной аэрозоль и распыляют терапевтические растворы и суспензии быстрее, чем традиционные струйные или ультразвуковые небулайзеры. Соответственно продолжительность лечения может быть сокращена с использова-

нием вибрационного меш-небулайзера по сравнению со струйным или ультразвуковым небулайзером. Вибрационные меш-небулайзеры, пригодные для использования в способах, описанных в данном документе, включают Philips Respironics I-Neb®, Omron MicroAir, Nektar Aeroneb® и Pari eFlow®.

Небулайзер может быть портативным и ручным по дизайну и может быть оснащен автономным электрическим блоком. Небулайзер может иметь насадку, которая имеет два совмещающихся выходных канала с определенным размером апертуры, обеспечивающей ускорение жидкой композиции. Это приводит к соударению двух потоков и распылению композиции. В небулайзере может быть использован механический исполнительный механизм для нагнетания жидкой композиции через насадку, имеющую множество отверстий с определенным(и) размером(ами) апертуры для продуцирования аэрозоля композиции для ингаляции. В конструкции небулайзеров однократной дозы могут быть использованы блистерные упаковки, содержащие однократные дозы композиции.

В настоящем изобретении небулайзер может обеспечивать оптимальную классификацию по размерам частиц для позиционирования частицы внутри, например, легочной мембраны.

После распыления распыленная композиция (именуемая также как "аэрозолизируемая композиция") находится в форме аэрозолизованных частиц. Аэрозолизируемая композиция может быть охарактеризована размером частиц аэрозоля, например путем измерения "масс-медианного аэродинамического диаметра" или "тонкодисперсной фракции", ассоциированной с аэрозолизуемой композицией. "Масс-медианный аэродинамический диаметр", или "MMAD", подвергают нормализации относительно аэродинамической сепарации аквааэрозольных капель и определяют путем измерений в импакторе, например в каскадном импакторе Андерсена (ACI) или импакторе нового поколения (NGI). Скорость газового потока в одном воплощении составляет 28 л в минуту для ACI и 15 л в минуту для NGI.

"Геометрическое стандартное отклонение", или "GSD", является мерой разброса аэродинамического распределения частиц по размерам. Низкие значения GSD характеризуют узкое распределение капель по размерам (капли однородного размера), которое является предпочтительным для направленной доставки аэрозоля в дыхательную систему. Средний размер капель распыленной композиции в одном воплощении составляет менее 5 мкм или от примерно 1 до примерно 5 мкм и имеет GSD в диапазоне от 1,0 до 2,2, или от примерно 1,0 до примерно 2,2, или от 1,5 до 2,2, или от примерно 1,5 до примерно 2,2.

Термин "тонкодисперсная фракция", или "FPF", использованный в данном документе, относится к фракции аэрозоля с размером частиц менее 5 мкм в диаметре, измеренном методом каскадной импакции. FPF обычно выражают в процентах.

В одном воплощении масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD) распыленной композиции составляет от примерно 1 до примерно 5 мкм, или от примерно 1 до примерно 4 мкм, или от примерно 1 до примерно 3 мкм, или от примерно 1 до примерно 2 мкм при измерении в каскадном импакторе Андерсена (ACI) или импакторе нового поколения (NGI). В другом воплощении MMAD распыленной композиции равен примерно 5 мкм или менее, примерно 4 мкм или менее, примерно 3 мкм или менее, примерно 2 мкм или менее или примерно 1 мкм или менее при измерении методом каскадной импакции, например в ACI или NGI.

В одном воплощении MMAD аэрозоля фармацевтической композиции составляет менее примерно 4,9 мкм, менее примерно 4,5 мкм, менее примерно 4,3 мкм, менее примерно 4,2 мкм, менее примерно 4,1 мкм, менее примерно 4,0 мкм или менее примерно 3,5 мкм при измерении методом каскадной импакции.

В одном воплощении MMAD аэрозоля фармацевтической композиции составляет от примерно 1,0 до примерно 5,0 мкм, от примерно 2,0 до примерно 4,5 мкм, от примерно 2,5 до примерно 4,0 мкм, от примерно 3,0 до примерно 4,0 мкм или от примерно 3,5 до примерно 4,5 мкм при измерении методом каскадной импакции (например в ACI или NGI).

В одном воплощении FPF аэрозолизуемой композиции составляет примерно 50% или более при измерении в ACI или NGI, составляет примерно 60% или более при измерении в ACI или NGI или составляет примерно 70% или более при измерении в ACI или NGI. В другом воплощении FPF аэрозолизуемой композиции составляет от примерно 50 до примерно 80%, или от примерно 50 до примерно 70%, или от примерно 50 до примерно 60% при измерении в NGI или ACI.

В одном воплощении дозирующий ингалятор (MDI) используют в качестве устройства для ингаляционной доставки композиций по настоящему изобретению. В дополнительном воплощении перед загрузкой в MDI соединение суспендируют в пропелленте (например в гидрофторуглероде). Базовая конструкция MDI содержит дозирующий клапан, исполнительный механизм и контейнер. Пропеллент используют для подачи композиции из устройства. Композиция может состоять из частиц определенного размера, суспендированных в находящемся(шихся) под давлением жидком(их) пропелленте(ах), или композиция может находиться в растворе или суспензии находящегося(шихся) жидкого(их) пропеллента(ов). Используемыми пропеллентами являются в основном не вредящие атмосфере гидрофторуглероды (HFC), такие как 134a и 227. Устройство ингаляционной системы может доставлять однократную дозу с использованием, например, блистерной упаковки, или оно может иметь многодозовую конструкцию. Дозирующий ингалятор под давлением ингаляционной системы может приводиться в действие вдохом для доставки в организм точной дозы липидсодержащей композиции. Для обеспечения точности дозирования доставка композиции может быть запрограммирована микропроцессором, чтобы она происходила

в определенной точке в ингаляционном цикле. MDI может быть портативным и ручным.

В одном воплощении сухой порошковый ингалятор (DPI) используют в качестве устройства для ингаляционной доставки композиций по настоящему изобретению. В одном воплощении DPI генерирует частицы, имеющие MMAD от примерно 1 до примерно 10 мкм, или от примерно 1 до примерно 9 мкм, или от примерно 1 до примерно 8 мкм, или от примерно 1 до примерно 7 мкм, или от примерно 1 до примерно 6 мкм, или от примерно 1 до примерно 5 мкм, или от примерно 1 до примерно 4 мкм, или от примерно 1 до примерно 3 мкм, или от примерно 1 до примерно 2 мкм в диаметре при измерении в NGI или ACI. В другом воплощении DPI создает частицы, имеющие MMAD от примерно 1 до примерно 10 мкм, или от примерно 2 до примерно 10 мкм, или от примерно 3 до примерно 10 мкм, или от примерно 4 до примерно 10 мкм, или от примерно 5 до примерно 10 мкм, или от примерно 6 до примерно 10 мкм, или от примерно 7 до примерно 10 мкм, или от примерно 8 до примерно 10 мкм, или от примерно 9 до примерно 10 мкм при измерении в NGI или ACI.

В одном воплощении MMAD частиц, генерируемых DPI, равен примерно 1 мкм или менее, примерно 9 мкм или менее, примерно 8 мкм или менее, примерно 7 мкм или менее, 6 мкм или менее, 5 мкм или менее, примерно 4 мкм или менее, примерно 3 мкм или менее, примерно 2 мкм или менее, или примерно 1 мкм или менее при измерении в NGI или ACI.

В одном воплощении MMAD частиц, генерируемых DPI, составляет менее примерно 9,9 мкм, менее примерно 9,5 мкм, менее примерно 9,3 мкм, менее примерно 9,2 мкм, менее примерно 9,1 мкм, менее примерно 9,0 мкм, менее примерно 8,5 мкм, менее примерно 8,3 мкм, менее примерно 8,2 мкм, менее примерно 8,1 мкм, менее примерно 8,0 мкм, менее примерно 7,5 мкм, менее примерно 7,3 мкм, менее примерно 7,2 мкм, менее примерно 7,1 мкм, менее примерно 7,0 мкм, менее примерно 6,5 мкм, менее примерно 6,3 мкм, менее примерно 6,2 мкм, менее примерно 6,1 мкм, менее примерно 6,0 мкм, менее примерно 5,5 мкм, менее примерно 5,3 мкм, менее примерно 5,2 мкм, менее примерно 5,1 мкм, менее примерно 5,0 мкм, менее примерно 4,5 мкм, менее примерно 4,3 мкм, менее примерно 4,2 мкм, менее примерно 4,1 мкм, менее примерно 4,0 мкм или менее примерно 3,5 мкм при измерении в NGI или ACI.

В одном воплощении MMAD частиц, генерируемых DPI, составляет от примерно 1,0 до примерно 10,0 мкм, от примерно 2,0 до примерно 9,5 мкм, от примерно 2,5 до примерно 9,0 мкм, от примерно 3,0 до примерно 9,0 мкм, от примерно 3,5 до примерно 8,5 мкм или от примерно 4,0 до примерно 8,0 мкм.

В одном воплощении FPF порошковой композиции, генерируемой DPI, составляет примерно 40% или более при измерении в ACI или NGI, составляет примерно 50% или более при измерении в ACI или NGI, составляет примерно 60% или более при измерении в ACI или NGI, или составляет примерно 70% при измерении в ACI или NGI. В другом воплощении FPF аэрозольизированной композиции составляет от примерно 40 до примерно 70%, или от примерно 50 до примерно 70%, или от примерно 40 до примерно 60% при измерении в NGI или ACI.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется приведенными ниже примерами. Однако следует отметить, что эти примеры, подобно воплощениям, описанным выше, являются иллюстративными и никоим образом не должны быть истолкованы как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Синтез алкиловых сложных эфиров трепростинила.

Получали соединения трепростинила, дериватизированные алкильными группами по карбоновокислотной группировке. Конкретно, трепростинил дериватизировали по карбоновокислотной группировке C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₆, и C₁₈ алкильными цепями (т.е. R₂ в формуле (A), приведенной ниже, представляет собой C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₆ или C₁₈ алкил) с получением алкиловых сложных эфиров трепростинила с различной длиной сложноэфирной цепи. Трепростинил может быть синтезирован, например, способами, раскрытыми в патентах США №№ 6765117 и 8497393. Синтез производных простагландина описан в патенте США № 4668814. Описания к патентам США №№ 6765117, 8497393 и 4668814 во всей их полноте для всех целей включены посредством ссылки.

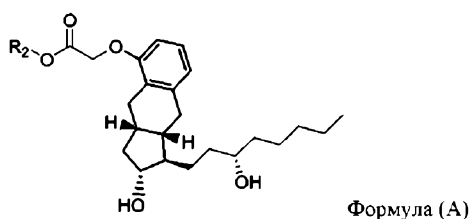


Схема 1.

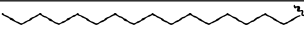
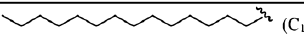
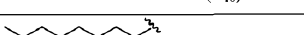
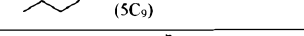
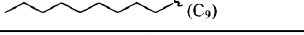
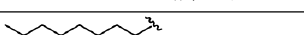
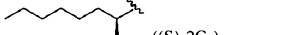
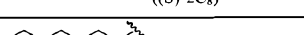
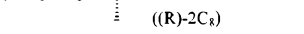
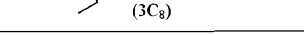
Этерификацию трепростинила катализировали сильноокислотной смолой Amberlyst® 15 (Rohm and Haas). Кислоту трепростинил растворяли в смеси безводный диоксан/спирт в концентрации 10 мг/мл (типично 4 мл). Добавляли спирт (R₂-OH), подходящий для образования цепи соответствующей длины в положении группы R₂. В качестве примера, для C₂ (этиловый сложный эфир) соединения спиртом являлся этанол. Молярное количество спирта в растворителе было в десять раз больше молярного количества трепростинила.

Трепростинил в диоксановом/спиртовом растворе добавляли к промытой и сухой смоле Amberlyst. На каждые 40 мг трепростинила добавляли 1 г смолы в стеклянном флаконе. Смесь помещали на шейкер и инкубировали в течение ночи при 40°C. Затем из флакона отбирали порцию жидкости и промывали ее дважды 3 мл диоксана. Весь выделенный растворитель затем собирали. Растворитель сушили потоком азота до окончания выпаривания. Оставшийся алкиловый сложный эфир трепростинила и нелетучий спирт (если использовали спирт с длинной цепью) растворяли в 2 мл смеси гексан/этилацетат 1:1 и очищали жидкостной экстракцией против равного объема фосфатного буферного раствора и затем воды. Затем органический слой отделяли и сушили потоком азота и дополнительно в вакууме. Если использовали спирт с длинной цепью, то требовалась дополнительная стадия очистки для отделения спирта жидкостной хроматографией. Использовали ACE CN, 5 мкм, колонку Ultra-Inert HPLC, 100×21,2 мм с подвижной фазой смесь гексан/пропанол 98:2%.

Схема 2.

К раствору (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксиоктил]-1H-бенз[f]инден-5-ил]окси]уксусной кислоты (трепростинил) (78,1 мг, 200 мкмоль), растворенному в 1,4-диоксане (2,0 мл), добавляли смолу Amberlyst® 15 (2,0 г) и спирт R₂-OH (2,0 ммоль, 10 экв.). Реакционную смесь нагревали до 40°C и встряхивали при приблизительно 100 об/мин в течение 18-196 ч. Растворитель удаляли, и смолу промывали ацетонитрилом (MeCN) (3×3 мл). 1,4-Диоксановые и MeCN экстракты объединяли и сушили, используя медленный поток подогретого газа N₂ и слабый нагрев, с получением густого воскообразного твердого вещества. Это неочищенное вещество растворяли в смеси 20% ¹⁸PrOH/гексаны и подвергали очистке препаративной HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография). Растворитель удаляли из очищенного вещества, используя медленный поток подогретого газа N₂ и слабый нагрев, с получением не совсем белого воскообразного твердого вещества. Это чистое вещество суспендировали в этиллактате для хранения и подвергали аналитической HPLC для определения концентрации.

В качестве примера следующие соединения формулы (A) были синтезированы способом схемы 2:

Группа R ₂	Сокращенное наименование соединения
R ₂ =  (C ₁₆)	C ₁₆ -TR
R ₂ =  (C ₁₄)	C ₁₄ -TR
R ₂ =  (C ₁₂)	C ₁₂ -TR
R ₂ =  (C ₁₀)	C ₁₀ -TR
R ₂ =  (2C ₉)	C ₉ -TR
R ₂ =  (5C ₉)	5C ₉ -TR
R ₂ =  (C ₉)	2C ₉ -TR
R ₂ =  ((S)-2C ₉)	(S)-2C ₉ -TR
R ₂ =  ((R)-2C ₉)	(R)-2C ₉ -TR
R ₂ =  (C ₈)	C ₈ -TR
R ₂ =  ((S)-2C ₈)	(S)-2C ₈ -TR
R ₂ =  ((R)-2C ₈)	(R)-2C ₈ -TR
R ₂ =  (3C ₈)	3C ₈ -TR
R ₂ =  (4C ₈)	4C ₈ -TR
R ₂ =  (C ₆)	C ₆ -TR
R ₂ =  (C ₅)	C ₅ -TR
R ₂ =  (C ₄)	C ₄ -TR
R ₂ =  (C ₃)	C ₃ -TR
R ₂ =  (C ₂)	C ₂ -TR

Общая схема синтеза этилового сложного эфира трепростинила показана на схеме 1 ниже. Спирт

может быть модифицирован с учетом желаемой длины алкилэфирной цепи (например, C₅-C₁₈алкиловые сложные эфиры четной или нечетной длины цепи, прямоцепочечные или разветвленные).

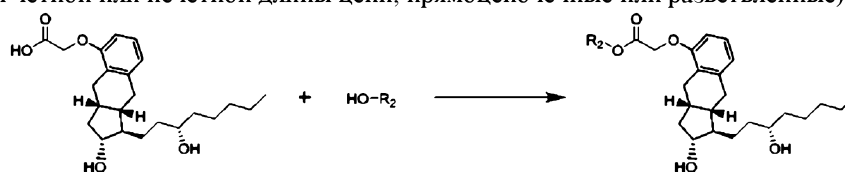


Схема 1. Механизм этерификации для соединений, представляющих собой алкиловый сложный эфир-TR.

Пример 2. Спонтанный и эстеразаопосредованный гидролиз алкиловых сложных эфиров трепростинила.

Спонтанный и/или эстеразаопосредованный гидролиз измеряли для композиций алкиловых сложных эфиров простаглицина, приведенных в табл. 2. Сх означает длину алкильной цепи в положении R₂ соединения формулы (А), приведенной выше.

Таблица 2

Компоненты композиций алкиловых сложных эфиров простаглицина

Ком-позиция	Сх-TR	Гидро-фобная добавка	ПЕГили-рованный липид	Сх-TR мол. %	Гидро-фобная добавка мол. %	ПЕГ-липид мол. %	ДОРС мол. %
T493	C ₂ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T500	C ₄ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T507	C ₆ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T508	C ₈ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T509	C ₁₀ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T554	C ₂ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T555	C ₈ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T556	C ₁₀ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T568	C ₁₂ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T623	C ₁₆ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T637	C ₁₈ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10

Дополнительно спонтанный гидролиз измеряли для 200 мкМ соединений трепростинила, дериватизированных по карбоновокислотной группе C₃, C₄, C₅, C₆, C₈ или C₁₀ алкильной группой в 20%-ном этаноле при 40°C в каждой из шести точек времени (0, 1, 2, 4, 6, 24 ч).

Каждый образец готовили в виде 200 мкМ раствора в 20%-ном этаноле. В каждой точке времени отбирали аликвоту для анализа методом HPLC для разделения оставшихся реагентов (C₃, C₄, C₅, C₆, C₈, C₁₀) или продукта их гидролиза (трепростинила). Для каждого образца процент гидролиза вычисляли из измеренных площадей пиков реагента и продукта:

% гидролиза=(площадь пика продукта/(площадь пика реагента+площадь пика продукта) ×100).

Результаты эксперимента в зависимости от времени представлены на фиг. 1А. Эти результаты показывают, что степень гидролиза коррелируется с длиной алкилэфирной группировки.

Эстеразаопосредованный гидролиз соединений и композиций трепростинила измеряли для соединений, дериватизированных по карбоновокислотной группе C₂, C₄, C₆, C₈ и C₁₀ алкильными группами, и композиций, содержащих такие соединения. Эксперименты проводили при 37°C, и гидролиз измеряли через 15, 30 мин и 1 ч после добавления эстеразы к раствору соединения. Реакционную смесь для каждого образца готовили в конечном объеме 500 мкл, содержащем 200 мкМ соединения трепростинила, 0,05 ед. эстеразы, 20% этанола и PBS. Гидролиз измеряли как описано выше.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 1В. Результаты показывают, что степень гидролиза соединения снижается с увеличением длины алкилэфирной цепи.

Превращение алкиловых сложных эфиров трепростинила в трепростинил также измеряли в присутствии гомогената ткани легкого крысы, собаки и обезьяны при 37°C. Здесь данные вычисляли на основе подгонки экспоненциального увеличения к максимуму (эксперименты выполняли в двух повторах). Результаты этого исследования представлены ниже в табл. 2А и на фиг. 37. Конкретно, на фиг. 37 слева показано, что превращение в трепростинил зависит от длины алкильной цепи. В этом эксперименте алкиловые сложные эфиры трепростинила инкубировали в течение 4 ч при конечной концентрации 200 нМ в 1 мл гомогената ткани, приготовленного в воде и нормализованного до 10 мг/мл белка.

На фиг. 37 справа показано превращение C₁₂-TR в трепростинил (в процентах) в присутствии гомогената ткани легкого крысы, собаки или обезьяны. C₁₂-TR инкубировали в течение 4 ч при конечной кон-

центрации 200 нМ в 1 мл гомогената ткани, приготовленного в воде и нормализованного к 10 мг/мл белка. Оба эксперимента, представленных на фиг. 37 (графики слева и справа), выполняли в двух повторях, и линии отображают нелинейную экспоненциальную регрессию, допускающую 1 фазовый распад.

Таблица 2А

Скорость превращения алкилового сложного эфира трепростинила в присутствии гомогената ткани легкого крысы, собаки или обезьяны

Скорость превращения алкилового сложного эфира трепростинила (нмоль/ч * г белка)	C ₈ -TR	C ₁₀ -TR	C ₁₂ -TR	C ₁₄ -TR
Крыса	32,5	7,3	1,1	0,4
Собака	49,8	10,5	2,2	–
Обезьяна	17,3	4,6	0,6	–

Пример 3. Характеризация размеров частиц композиций трепростинила.

Композиции, указанные в табл. 3, характеризовали по размеру частиц. C_x означает длину алкильной цепи в положении R₂ формулы (А), приведенной выше.

Таблица 3

Характеризация композиции по размеру частиц

Композиция	C _x -TR	Гидрофобная добавка	ПЕГилированный липид	C _x -TR мол. %	Гидрофобная добавка мол. %	ПЕГилированный липид мол. %	DOPC мол. %
T554 (C ₂)	C ₂ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T499 (C ₃)	C ₃ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T500 (C ₄)	C ₄ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T501 (C ₅)	C ₅ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	20	0
T601 (C ₆)	C ₆ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T555 (C ₈)	C ₈ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T556 (C ₁₀)	C ₁₀ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T568 (C ₁₂)	C ₁₂ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T623 (C ₁₆)	C ₁₆ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10
T637 (C ₁₈)	C ₁₈ -TR	Сквалан	Chol-PEG2k	40	40	10	10

Все измерения размеров частиц выполняли, используя прибор для измерения размера частиц Wyatt Technology Mobius™ Zeta Potential/Particle Sizing Instrument, в режиме квазиупругого рассеяния света (QELS). Аликвоты композиций разбавляли 10-кратно в предварительно профильтрованной (фильтр с размером пор 0,02 мкм) ультрачистой деионизированной H₂O. Данные по светорассеянию собирали и конвертировали в размер частиц и распределение по размерам, используя прибор с программным обеспечением Dynamics® v. 7.2.4. Указанный средний диаметр частиц основан на кумулянтной модели, которая математически подгоняет константы диффузии частиц (определенные по необработанным интенсивностям рассеянного излучения частиц в суспензии) с получением среднего размера частиц и распределения частиц по размерам приблизительно среднего диаметра.

Было обнаружено, что размер частиц (средний диаметр частиц) композиций трепростинила увеличивается в композициях, содержащих C₂-C₅алкиловый сложный эфир трепростинила, и снижается в композициях, содержащих C₆-C₁₂алкиловый сложный эфир трепростинила. Эти результаты представлены на фиг. 2. Наибольший средний диаметр частиц обнаружен для композиций, содержащих пентиловый эфир трепростинила (т.е. трепростинил, дериватизированный C₅алкиловым сложным эфиром) (316 нм). Композиции, содержащие этиловый сложный эфир трепростинила, имели средний диаметр частиц 41 нм. Следует понимать, что при преобразовании параметров обработки одинаковые композиции могут быть получены с разными средними диаметрами и распределениями частиц по размерам. Преобразования

композиции в сочетании с преобразованием параметров обработки могут быть выполнены также с получением частиц различных размеров.

В использованных условиях было также обнаружено, что соединения трепростинила, дериватизированные более длинной цепью, образовывали более однородные частицы, чем соединения с более короткими алкилэфирными цепями. Однородность частиц определяли с использованием вычисленной с помощью программного обеспечения полидисперсности (%PD). Полидисперсность определяют как стандартное отклонение распределения частиц по размерам от значения среднего размера частиц. %PD нормализует полидисперсность к среднему диаметру путем деления на средний размер и умножения на 100. Эти параметры показывают, имеет ли суспензия частиц одну или более совокупностей размеров частиц (мономодальное против мультимодального). Это также дает представление о широте распределения частиц по размерам (или степени однородности частиц) вокруг среднего значения для соответственных совокупностей частиц.

Dynamics® параметр полидисперсности представляет собой монодисперсную совокупность частиц, если %PD ≤ 15. Вычисленный %PD ≥ 57% означает полидисперсную совокупность частиц. Например, данные по %PD, нанесенные на график на фиг. 2, дают информацию об однородности совокупностей размеров частиц в протестированных соединениях трепростинила. Алкиловые сложные эфиры C₈-TR (TR=трепротинил), C₁₀-TR, C₁₂-TR и C₁₄-TR имели почти монодисперсные частицы с %PD, равным или приблизительно равным 15. Алкиловые сложные эфиры C₂-TR, C₆-TR, C₁₆-TR и C₁₈-TR имели частицы с %PD слегка выше 15, что свидетельствует о том, что имеет место одна совокупность частиц. Однако эти частицы обладали более широким распределением частиц по размерам вокруг среднего размера частиц по сравнению с C₈-TR, C₁₀-TR, C₁₂-TR, и C₁₄-TR. C₃-TR, C₄-TR, и C₅-TR показали %PD намного больше 15, а некоторые ≥ 57. Эти значения показывают, что имеется множество совокупностей частиц, которые имеют широкое распределение частиц по размерам.

Пример 4. Измерение уровней циклического аденозинмонофосфата (сAMP) в клетках CHO-K1 в ответ на композиции трепростинила.

Анализ на клетках яичника китайского хомячка K1 (CHO-K1), основанный на анализе сAMP GloSensor™ (Promega), использовали для определения воздействия алкиловых сложных эфиров трепростинила на уровни сAMP.

сAMP является вторичным мессенджером, вовлеченным в сигнальную трансдукцию сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), действующим через белки Gα-s и Gα-i. Поскольку рецептор трепростинила представляет собой GPCR, данный анализ показывает, связывает ли соответствующее простациклиновое соединение (или его метаболит) его рецептор и активирует ли GPCR каскад клеточной передачи сигнала.

В анализе GloSensor™ используется генетически модифицированная форма люциферазы светлячков, в которую вставлена сAMP-связывающая белковая группировка. Связывание сAMP вызывает конформационное изменение, приводящее к увеличению светоотдачи.

Простаноидный рецептор EP2 котрансфицировали с плазмидой GloSensor™ (Promega) в клетки CHO-K1 следующим образом: клетки CHO-K1 собирали, когда монослой был на 50-90% конфлюэнтным. Сначала клетки промывали 5 мл PBS. Добавляли 2 мл подогретой (37°C) смеси 0,05% трипсина-EDTA (Life Technologies, номер по каталогу: 25300054), и клетки сбивали со стенок постукиванием по колбе. Затем добавляли 10 мл не содержащей антибиотиков ростовой среды (Life Tech, номер по каталогу: 31765092), содержащей 10% сыворотки плода коровы (FBS; Hyclone, номер по каталогу: SH30071.03), и клетки центрифугировали при 250 ×g в течение 5 мин при комнатной температуре. Среду аспирировали, и клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл ростовой среды. Количество клеток определяли, используя гематокситометр. В каждую лунку обработанного культурального 96-луночного планшета с плоским дном (Costar, номер по каталогу: 3917) высевали 1×10⁴ клеток на 100 мкл не содержащей антибиотиков ростовой среды. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой.

Для маломасштабных трансфекций до 20 лунок смесь плазмиды pGloSensor-22F сAMP (Promega, номер по каталогу: E2301) (2 мкг); (EP2) (10 нг) (Origene, номер по каталогу: SC126558); pGEM-3Zf(+) (10 нг) (Promega, номер по каталогу: P2271) разводили до конечной концентрации 12,6 нг/мкл (общая плазмиды) в очищенной от сыворотки среде Opti-MEM I (Life Technologies, номер по каталогу: 1985062). Затем 6 мкл реагента для трансфекций FuGENE HD (Promega, номер по каталогу: E2311) добавляли к 160 мкл разведенной плазмиды и тщательно смешивали легким пипетированием. Комплекс инкубировали при комнатной температуре в течение 0-10 мин, а затем добавляли 8 мкл комплекса на лунку 96-луночного белого аналитического планшета (Costar, номер по каталогу: 3917) и слегка смешивали, не разрушая клеточный монослой. Планшеты инкубировали в течение 20-24 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой. После инкубирования клетки обрабатывали и анализировали.

Для крупномасштабных трансфекций вышеупомянутые стадии масштабировали соответственно, и клетки замораживали после последнего инкубирования. Для того чтобы получить замороженные трансфицированные клетки CHO-K1, среду аспирировали из колб с культурой, и клетки промывали 5 мл PBS.

Как и ранее, добавляли 2 мл подогретой (37°C) смеси 0,05% трипсина-EDTA (Life Technologies, номер по каталогу: 25300054), и клетки сбивали со стенок постукиванием по колбе. Затем добавляли 10 мл не содержащей антибиотиков ростовой среды (Life Technologies, номер по каталогу: 31765092), содержащей 10% FBS (Hyclone, номер по каталогу: SH30071.03), и клетки центрифугировали при 250 ×g в течение 5 мин при комнатной температуре. Количество клеток определяли, используя гематокситометр. Среду аспирировали, и клеточный осадок ресуспендировали в замораживающей среде (Millipore, номер по каталогу: S-002-5F) при $2,5 \times 10^6$ клеток на флакон. Трансфицированные клетки инкубировали в течение ночи при -80°C, после чего переносили в жидкий азот для длительного хранения. Замороженные исходные клетки затем оттаивали за день до использования для анализов, и клетки засеивали при $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку в 100 мкл не содержащей антибиотиков полной среды (F12 (Life Technologies, номер по каталогу: 31765092)+10% FBS (Hyclone, номер по каталогу: SH30071.03)). После инкубирования в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой клетки были готовы для использования в анализах cAMP-ответа.

В процессе подготовки для измерения cAMP перед обработкой клетки уравнивали реагентом GloSensor cAMP. Для уравнивания среду осторожно удаляли из отдельной лунки. Затем 100 мкл среды для уравнивания (6% об./об. исходного раствора GloSensor Reagent (Promega, номер по каталогу: E291), 10% FBS (Hyclone, номер по каталогу: SH30071.03) и 88% CO₂ независимую среду (Life Technologies, номер по каталогу: 18045088)) добавляли на лунку 96-луночного планшета и добавляли ближе к краю каждой лунки. Планшет затем инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Первое измерение показателей предварительного считывания выполняли, используя микропланшет-ридер (MicroLumat Plus). Планшеты инкубировали в течение еще 10 мин при комнатной температуре, после чего осуществляли второе измерение показателей предварительного считывания.

Рабочие растворы свободного трепростинила и алкиловых сложных эфиров трепростинила готовили в 10X концентрации таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 1X сразу после добавления к клеткам. После обработки каждый планшет считывали каждые 5 мин на протяжении анализа, используя микропланшет-ридер (MicroLumat Plus). Для определения кратности изменения уровня cAMP относительно контроля сначала определяли эффективность трансфекции путем деления показателя второго предварительного считывания на среднее значение соответствующих показателей предварительных считываний. Затем нормализованные относительные световые единицы (RLU) образцов определяли путем деления показателя, полученного при считывании планшета, на эффективность трансфекции. Кратность изменения уровня cAMP относительно контроля затем определяли путем деления нормализованной RLU образцов на нормализованную RLU контроля.

Проверка достоверности анализа cAMP с использованием свободного трепростинила.

Достоверность анализа cAMP проверяли, используя свободный трепростинил. Трепростинил (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001 и 0,000001 мкМ) добавляли к уравновешенным клеткам CHO-K1, и клетки затем инкубировали в течение 30 мин. Люминесценцию затем измеряли при комнатной температуре.

Композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила.

Клетки CHO-K1, котрансфицированные рецептором EP2 и плазмидой GloSensor™, стимулировали свободным трепростинилом (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001 мкМ) и соединениями, представляющими собой алкиловые сложные эфиры трепростинила, т.е. соединениями, имеющими C₆, C₈ или C₁₀ прямоцепочечную алкильную группу в положении группы R₂ соединения формулы (A), показанной выше.

Измерения проводили при следующих концентрациях соединений: 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001 мкМ. Уровни cAMP затем измеряли каждые 5 мин на протяжении 8 ч. Результаты, полученные при трех наивысших концентрациях, представлены на фиг. 3A (10 мкМ), фиг. 3B (1 мкМ) и фиг. 3C (0,1 мкМ). Компоненты композиций трепростинила, указанных на фиг. 3A, 3B и 3C, приведены в табл. 4 ниже.

Уровни cAMP в ответ на дециловый сложный эфир трепростинила (C₁₀-TR) (10 мкМ) были эквивалентны свободному трепростинилу, и уровни поддерживались в течение по меньшей мере 6 ч. Поддержание уровня cAMP не было продемонстрировано в ответ на свободный трепростинил.

Клетки CHO-K1, котрансфицированные рецептором EP2 и плазмидой GloSensor™, стимулировали свободным трепростинилом (5 мкМ) и композициями трепростинила, имеющими трепростинил, дериватизированный по группе R₂ вышеуказанного соединения C₂, C₆, C₈, C₁₀, или C₁₂ прямоцепочечной группой (5 мкМ). Компоненты композиций трепростинила приведены в табл. 5 ниже. Уровни cAMP затем измеряли каждые 5 мин на протяжении 8 ч.

Результаты этих экспериментов с использованием дозы 5 мкМ представлены на фиг. 4 и 5. cAMP-ответ на C₂ и C₁₀ алкиловые сложные эфиры трепростинила (5 мкМ) был больше или эквивалентен ответу, вызванному свободным трепростинилом (фиг. 4). Уровни cAMP в ответ на C₂ и C₁₀ алкиловые сложные эфиры трепростинила поддерживались значительно дольше, чем в ответ на свободный трепростинил и C₆-, C₈-, и C₁₂-производные трепростинила.

Таблица 4

Композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила, представленные на фиг. 3

Композиция (Cx-TR)	Cx-TR мол. %	Токо- ацетат мол. %	Chol- PEG2000 мол. %	Сквалан мол. %	DOPC мол. %	Макс. уровень сAMP (кратный)
Трепростинил	100					~16
T543 (C ₆ -TR)	40	40	20	0		~8
T555 (C ₈ -TR)	40		10	40	10	~14
T556 (C ₁₀ -TR)	40		10	40	10	~16

Таблица 5

Композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила, представленные на фиг. 4

Композиция (Cx-TR) (концентрация)	Cx-TR мол. %	Chol- PEG2000 мол. %	Сквалан мол. %	DOPC мол. %	Макс. уровень сAMP (кратный)
Трепростинил	100				~14
T554 (C ₂ -TR) (5 мкМ)	40	10	40	10	~24
T601 (C ₆ -TR) (5 мкМ)	40	10	40	10	
T555 (C ₈ -TR) (5 мкМ)	40	10	40	10	~13
T556 (C ₁₀ -TR) (5 мкМ)	40	10	40	10	~17
T568 (C ₁₂ -TR) (5 мкМ)	40	10	40	10	~9

Соединения трепростинила.

Анализ сAMP на клетках (CHO-K1) также использовали для определения воздействия соединений трепростинила не в составе композиции (т.е. соединений без гидрофобной добавки и/или амфифильного агента, такого как PEG илированный липид) на уровни сAMP.

Клетки CHO-K1, котрансфицированные рецептором EP2 и плазмидой GloSensor™, стимулировали свободным трепростинилом (5 мкМ) и производными трепростинила, имеющими C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₈, C₁₀, или C₁₂ прямоцепочечную алкилэфирную группировку (5 мкМ). Уровни сAMP затем измеряли каждые 5 мин на протяжении 8 ч.

Результаты этих экспериментов представлены на фиг. 5. C₂ и C₁₀ алкиловые сложные эфиры трепростинила индуцировали уровни сAMP-ответа, эквивалентные ответу на свободный трепростинил. Было установлено, что C₁₂-derivatизированное соединение трепростинила вызывает наименьший сAMP-ответ.

Распыляемые композиции сложных эфиров трепростинила.

Анализ сAMP на клетках (CHO-K1), описанный выше, использовали также для определения воздействия распыления различных композиций трепростинила на уровни сAMP.

Клетки CHO-K1, котрансфицированные рецептором EP2 receptor и плазмидой GloSensor™, стимулировали 10 мкМ свободным трепростинилом (контрольным или распыленным) и 10 мкМ композициями трепростинила, содержащими соединение, derivatизированное C₂, C₈, C₁₀, или C₁₂ прямоцепочечной алкильной группой в положении R₂ соединения формулы (A), приведенной выше (контрольными или распыленными).

Композиции, протестированные в этом эксперименте, приведены в табл. 6 ниже (результаты на фиг. 6). Уровни сAMP затем измеряли каждые 5 мин на протяжении 8 ч.

Небулайзер Aeroneb Pro (Aerogen) использовали для распыления композиций производных трепростинила. Желаемый объем композиции (обычно 3 мл) загружали в меш-насадку небулайзера. Насадку напрямую соединяли со стеклянным импинджером с воздухонепроницаемой уплотнительной прокладкой. Распыление проводили, используя заводские установки параметров, до распыления всего образца. После окончания распыления насадку отсоединяли; импинджер закрывали крышкой и центрифугировали 5 мин при 600 ×g для осаждения аэрозоля внутри импинджера. Эта процедура обеспечивала почти 100%-ный выход при сборе распыленного образца.

Как показано на фиг. 6, распыление композиции derivatизированного трепростинила не оказывало пагубного воздействия на уровни ответа сAMP или продолжительность ответа.

Таблица 6

Композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила: воздействие распыления

(5 мкМ) Сх-TR	Сх-TR мол. %	Chol- PEG2000 мол. %	Сквалан мол. %	DOPC мол. %	Макс. уровень сАМР (кратный)
Трепростинил	100				~15
T554 (C ₂ -TR)	40	10	40	10	~22
T555 (C ₈ -TR)	40	10	40	10	~13
T556 (C ₁₀ -TR)	40	10	40	10	~18
T568 (C ₁₂ -TR)	40	10	40	10	~13

Сравнение соединений трепростинила и композиций, содержащих их.

Полумаксимальные эффективные концентрации (EC₅₀) различных соединений трепростинила определяли, используя результаты анализов сАМР. В табл. 7 (ниже) суммированы данные по EC₅₀ для сАМР-ответа в клетках CHO-K1 для следующих композиций и соединений:

T554 (40 мол. % C₂-TR, 40 мол. % сквалана, 10 мол. % chol-PEG2k, 10 мол. % DOPC),
 T612 (10 мол. % C₂-TR, 90 мол. % DMPE-PIK),
 T501 (40 мол. % C₅-TR, 40 мол. % сквалана, 20 мол. % Chol-PEG2k),
 T601 (40 мол. % C₆-TR, 40 мол. % сквалана, 10 мол. % chol-PEG2k, 10 мол. % DOPC),
 T555 (40 мол. % C₈-TR, 40 мол. % сквалана, 10 мол. % chol-PEG2k, 10 мол. % DOPC),
 T556 (40 мол. % C₁₀-TR, 40 мол. % сквалана, 10 мол. % chol-PEG2k, 10 мол. % DOPC),
 T568 (40 мол. % C₁₂-TR, 40 мол. % сквалана, 10 мол. % chol-PEG2k, 10 мол. % DOPC),
 T621 (10 мол. % C₁₂-TR, 90 мол. % DPPE-P2K),
 T623 (40 мол. % C₁₆-TR, 40 мол. % сквалана, 10 мол. % chol-PEG2k, 10 мол. % DOPC),
 T622 (10 мол. % C₁₆-TR, 90 мол. % DPPE-P2K),
 C₂-TR (100 мол. %),
 C₈-TR (100 мол. %),
 C₁₂-TR (100 мол. %) и
 свободный трепростинил.

Подмножество кривых доза-ответ для выбранных соединений и композиций трепростинила представлено на фиг. 7-14. Со свободным трепростинилом сила действия снижается с увеличением времени инкубирования (поддерживая немедленный ответ), тогда как все различные композиции трепростинила демонстрируют увеличение силы действия с течением времени инкубирования (свидетельствующее о профиле замедленного высвобождения).

Таблица 7

Значения EC₅₀ для композиций трепростинила

Образцы	EC ₅₀ (мкМ)									
	0,5 ч	1,0 ч	2,0 ч	3,0 ч	4,0 ч	4,5 ч	5,0 ч	6,0 ч	7,0 ч	8,0 ч
Трепростинил	0,18	0,28	0,15	0,16	0,19	0,2	0,26	0,29	0,46	0,44
T554 (C ₂ -TR)	5,96	6,05	5,25	2,43	2,14	2,12	2,22	2,31	2,28	1,96
T501 (C ₅ -TR)	15,4	15,4	10,9	5,98	5,64	5,07	5,07	4,46	4,11	3,92
T601 (C ₆ -TR)	~0,0093	45,2	14,4	75,0	22,0	21,3	24,5	9,35	6,17	4,94
T555 (C ₈ -TR)	20,8	15,1	5,65	4,10	2,99	2,66	2,41	2,03	1,71	1,48
T556 (C ₁₀ -TR)	~6,83	4,94	1,69	1,80	2,20	2,09	2,34	1,78	1,51	2,20
T568 (C ₁₂ -TR)	12,2	8,07	6,54	4,12	3,21	3,06	2,37	2,33	2,24	2,03
T631 (C ₁₄ -TR)	~0,0015	~0,0088	34,1	12,4	3,97	2,79	2,17	1,88	1,45	1,23
T623 (C ₁₆ -TR)	13,7	~0,0090	42,9	24,8	5,10	4,59	3,87	2,78	1,97	1,77
C ₂ -TR (ограничение)	2,43	2,27	1,75	1,81	1,88	1,84	1,91	1,68	1,71	1,65
C ₈ -TR (ограничение)	3,69	3,39	1,69	1,42	1,53	1,41	1,4	1,4	1,34	1,09
C ₁₂ -TR (ограничение)	4,98	5,35	4,54	4,07	3,13	3,17	2,94	3,25	3,17	2,9
T612 (C ₂ -TR)	10,0	7,08	7,9	2,23	2,76	1,54	0,88	0,44	0,41	0,28
T622 (C ₁₆ -TR)	~0,012	24,6	3,53	2,2	8,29	25,2	16,3	3,9	1,90	1,14

Ограничение: все значения EC₅₀ были получены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5. Для образцов C₂-TR, C₈-TR и C₁₂-TR данные анализировали с ограничением верхнего и нижнего параметров постоянным числом, соответствующим наивысшему и наименьшему значениям соответственно, полученным из анализа сАМР;

* для образцов T612 (C₂-TR) и T622 (C₁₆-TR): из-за токсичности при более высоких концентрациях те значения были исключены из анализов с целью получения значения EC₅₀.

Пример 5. Определение воздействия соединений трепростинила на пролиферацию клеток.

Для определения какого-либо воздействия соединений трепростинила на пролиферацию клеток осуществляли клеточные анализы на клетках CHO-K1 и крысиных альвеолярных клетках (клетки NR8383).

Клетки CHO-K1.

Клетки CHO-K1 собирали, когда клеточный монослой был на 50-90% конфлюэнтным (использовать пассаж 4-11). Среду аспирировали из колбы, и клетки промывали 2 мл среды F12. Затем добавляли 1 мл подогретой (37°C) смеси 0,25% трипсина-EDTA (Life Technologies, Cat#: 25300054), и клетки сбивали со стенок постукиванием по колбе. Затем добавляли полную ростовую среду F12 (Life Technologies, номер по каталогу: 31765092)+10% FBS (Hyclone, номер по каталогу: SH30071.03)+1X Pen-Strep (Life Technologies, каталожный № 15140-122) в объеме 10 мл. Клетки центрифугировали при 250 ×g в течение 5 мин при комнатной температуре, и среду аспирировали. Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл полной ростовой среды. Количество клеток определяли, используя гемацитометр. Клетки затем засевали в количестве 2000 клеток на лунку в 96-луночный планшет в 100 мкл полной ростовой среды. Планшет инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой.

На следующий день 80 мл свежей полной среды добавляли в каждую лунку, и клетки CHO-K1 стимулировали обработкой соединениями и композициями трепростинила. Готовили рабочие растворы в 10X концентрации, и после 2-кратных последовательных разведений добавляли аликвоты по 20 мкл на лунку до конечной 1X концентрации. После инкубирования в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток. Планшеты анализировали, используя 20 мкл реагента Presto Blue (Life Technologies, номер по каталогу: A13262) на лунку. Реагент смешивали, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой. Планшеты считывали, используя микропланшет-ридер CytoFluor Series 4000 (PerSeptive BioSystems) или Synergy Neo (BioTek) при длине волны эмиссии λ 590 нм и длине волны возбуждения λ 560 нм. Процент ингибирования определяли, используя следующую формулу:

% ингибирования = 100% - (обработанные образцы / контроль × 100%).

Клетки NR8383.

Крысиные альвеолярные клетки NR8383 собирали, когда монослой был на 50-90% конфлюэнтным (использовать пассаж 5-11). Поскольку клетки NR8383 включают как адгезивные, так и неадгезивные клетки, среду переносили в пробирку Falcon на 50 мл. Чтобы получить клетки, оставшиеся в колбе, добавляли 2 мл среды без исследуемых компонентов, и оставшиеся клетки соскребали с 75 см² колбы скребком для клеток и добавляли в 50-миллилитровую пробирку. Клетки центрифугировали при 200 ×g в течение 5 мин при комнатной температуре, и среду аспирировали. Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл полной ростовой среды (F12 (Life Technologies, номер по каталогу: 31765092)+15% FBS - инактивированный нагреванием (Hyclone, номер по каталогу: SH30071.03)+1X Pen-Strep (Life Technologies, номер по каталогу: 15410 - 122)). Количество клеток определяли, используя гемацитометр. Клетки затем засевали в количестве 4000 клеток на лунку в 96-луночный планшет в 100 мкл полной ростовой среды. Планшет инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой.

На следующий день 80 мкл свежей полной среды добавляли в каждую лунку, и клетки NR8383 стимулировали обработкой соединениями трепростинила. После инкубирования в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с водяной рубашкой определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток. Измерения и вычисления производили, как описано выше для клеток CHO-K1.

Воздействие композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила на пролиферацию клеток CHO-K1.

Клетки CHO-K1 стимулировали композициями, содержащими алкиловые сложные эфиры трепростинила: T554 (40 мол.% C₂-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), T543 (40 мол.% C₆-TR, 40 мол.% Тосо Асет, 10 мол.% chol-PEG2k), T555 (40 мол.% C₈-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), T556 (40 мол.% C₁₀-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), T568 (40 мол.% C₁₂-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), T623 (40 мол.% C₁₆-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) в концентрациях в диапазоне от 0,55 до 125 мкМ. После инкубирования в течение 48 ч определяли ингибирующее воздействие композиций производных трепростинила на пролиферацию клеток.

В табл. 8 суммировано воздействие вышеуказанных композиций трепростинила на пролиферацию клеток CHO-K1. При наивысшей концентрации 100 мкМ только T543 (C₆-TR) и T623 (C₁₆-TR) демонстрировали значительное ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток.

Таблица 8

Воздействие композиций трепростинила на пролиферацию клеток

Образцы	Клетки CHO-K1	Клетки NR8383
	(< 100 мкМ-0,78 мкМ)	(≤ 100 мкМ-0,78 мкМ)
T543 (C ₆ -TR)	Детектируемое ингибирование клеток только при концентрации 100 мкМ	Детектируемое ингибирование клеток только при концентрации > 25 мкМ
T554 (C ₂ -TR)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Ингибирование пролиферации клеток детектируется при 70 мкМ
T555 (C ₈ -TR)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации > 50 мкМ
T556 (C ₁₀ -TR)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации > 50 мкМ
T568 (C ₁₂ -TR)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации > 100 мкМ
T623 (C ₁₆ -TR)	Ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации 100 мкМ	Ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации 100 мкМ

Воздействие композиций трепростинила на пролиферацию клеток NR8383.

Крысиные альвеолярные клетки NR8383 стимулировали такими же композициями производных трепростинила: T543 (40 мол.% C₆-TR, 40 мол.% Тосо Асе., 20 мол.% Chol-PEG2k), T554 (C₂-TR 40 мол.%, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), T555 (40 мол.% C₈-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), T556 (40 мол.% C₁₀-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), T568 (40 мол.% C₁₂-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) и T623 (40 мол.% C₁₆-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) при таких же концентрациях (от 0,55 до 125 мкМ), как и для клеток CHO-K1, указанных выше. После инкубирования в течение 72 ч определяли ингибирующее воздействие композиций производных трепростинила на пролиферацию клеток.

В табл. 8 суммировано воздействие вышеуказанных композиций трепростинила на пролиферацию клеток NR8383. При наивысшей дозе 100 мкМ все композиции производных трепростинила демонстрировали некоторое ингибирование пролиферации клеток, а T543 (C₆-TR) продемонстрировала наибольшее ингибирующее воздействие.

Воздействие алкиловых сложных эфиров трепростинила на пролиферацию клеток.

Для определения какого-либо воздействия производных трепростинила (не в составе композиции) на пролиферацию клеток осуществляли клеточные анализы, описанные выше, используя клетки CHO-K1 и крысиные альвеолярные клетки (клетки NR8383).

Анализ пролиферации клеток CHO-K1.

Клетки CHO-K1 стимулировали алкиловыми сложными эфирами трепростинила, т.е. соединениями TR формулы (А), имеющими следующие группы R₂:

C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₈, C₁₀ или C₁₂ прямоцепочечный алкил в дозировках в диапазоне от 0,098 до 25 мкМ. После инкубирования в течение 48 ч определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток.

В табл. 9 ниже суммировано воздействие вышеуказанных алкиловых сложных эфиров трепростинила на пролиферацию клеток CHO-K1 и NR8383. При наивысшей концентрации только соединение октиловый сложный эфир трепростинила показало ингибирование пролиферации клеток.

Таблица 9

Воздействие алкиловых сложных эфиров трепростинила на пролиферацию клеток

Образцы	Клетки CHO-K1	Клетки NR8383
	(0,195 мкМ-25 мкМ)	(0,195 мкМ-25 мкМ)
C ₂ -TR	Ингибирование клеток не	Ингибирование клеток не

	детектируется	детектируется
C ₃ -TR	Ингибирование клеток не детектируется	Ингибирование клеток не детектируется
C ₄ -TR	Ингибирование клеток не детектируется	Ингибирование клеток не детектируется
C ₅ -TR	Ингибирование клеток не детектируется	Ингибирование клеток не детектируется
C ₆ -TR	Ингибирование клеток не детектируется	Ингибирование клеток не детектируется
C ₈ -TR	Ингибирование клеток детектируется при 25 мкМ	Некоторое ингибирование клеток детектируется
C ₁₀ -TR	Ингибирование клеток не детектируется	Ингибирование клеток не детектируется
C ₁₂ -TR	Ингибирование клеток не детектируется	Ингибирование клеток не детектируется

Анализ пролиферации клеток NR8383.

Крысинные альвеолярные клетки NR8383 стимулировали соединениями трепростинила, дериватизированными в положении R₂ формулы (А) C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₈, C₁₀ или C₁₂ прямоцепочечной алкильной группировкой в концентрациях в диапазоне от 0,195 до 25 мкМ. После инкубирования в течение 72 ч определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток.

В табл. 11 выше суммировано воздействие вышеуказанных алкиловых сложных эфиров трепростинила на пролиферацию клеток NR8383. Аналогично анализу на клетках CHO-K1 только октиловый сложный эфир трепростинила показал некоторое ингибирование пролиферации клеток при наивысшей концентрации.

Композиции производных трепростинила - воздействие на пролиферацию клеток.

Для определения эффекта композиций производных трепростинила на пролиферацию клеток осуществляли клеточный анализ, используя клетки CHO-K1 и крысинные альвеолярные клетки (клетки NR8383).

Воздействие композиций трепростинила на пролиферацию клеток CHO. Клетки CHO-K1 стимулировали композициями производных трепростинила: T596 (45 мол.% C₂-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T597 (45 мол.% C₆-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T598 (45 мол.% C₈-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T599 (45 мол.% C₁₀-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T600 (45 мол.% C₁₂-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T612 (10 мол.% C₂-TR, 90 мол.% DMPE-P1K), T613 (10 мол.% C₈-TR, 90 мол.% DMPE-P1K) при концентрациях в диапазоне от 0,23 до 29 мкМ. После инкубирования в течение 72 ч определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток. После инкубирования в течение 48 ч определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток.

В табл. 10 ниже суммировано воздействие композиций трепростинила на пролиферацию клеток CHO-K1. Ни одна из протестированных композиций не продемонстрировала значительное ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток CHO-K1.

Таблица 10

Воздействие композиций трепростинила на пролиферацию клеток

Образцы	Клетки CHO-K1	Клетки NR8383
Концентрация образца	(29 мкМ-0,23 мкМ)	(29 мкМ-0,23 мкМ)
T596 (C ₂)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Некоторое ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации > 25 мкМ
T597 (C ₆)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Некоторое ингибирование пролиферации клеток детектируется при 70 мкМ
T598 (C ₈)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Некоторое ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации > 50 мкМ
T599 (C ₁₀)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Некоторое ингибирование пролиферации клеток детектируется при концентрации ≥ 14,5 мкМ

Образцы	Клетки CHO-K1	Клетки NR8383
T600 (C ₁₂)	Ингибирование пролиферации клеток не детектируется	Некоторое ингибирование пролиферации клеток детектируется при концентрации $\geq 14,5$ мкМ
Концентрация образца	(180 мкМ-1,41 мкМ)	(180 мкМ-1,41 мкМ)
T612 (C ₂)	Ингибирование пролиферации клеток детектируется при концентрации ≥ 90 мкМ	Ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации 180 мкМ
T613 (C ₈)	Ингибирование пролиферации клеток детектируется при концентрации ≥ 90 мкМ	Ингибирование пролиферации клеток детектируется только при концентрации 180 мкМ

Аналогично, клетки CHO-K1 стимулировали композициями трепростинила T612 (R₂=C₂) и T613 (R₂=C%) в концентрациях в диапазоне от 1,41 до 180 мкМ. Через 48 ч определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток, и все четыре композиции трепростинила продемонстрировали 100%-ное ингибирование пролиферации клеток при высших концентрациях.

Воздействие композиций трепростинила на пролиферацию клеток NR8383.

Крысиные альвеолярные клетки NR8383 стимулировали теми же композициями трепростинила (вышеуказанными), а также T596 (45 мол.% C₂-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T612 (10 мол.% C₂-TR, 90 мол.% DMPE-P1K), T597 (45 мол.% C₆-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T598 (45 мол.% C₈-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T613 (10 мол.% C₈-TR, 90 мол.% DMPE-P1K), T599 (45 мол.% C₁₀-TR, 55 мол.% DSG-P2K), T600 (45 мол.% C₁₂-TR, 55 мол.% DSG-P2K) и при таких же концентрациях (от 0,23 до 29 мкМ), как и для клеток CHO-K1, указанных выше. После инкубирования в течение 72 ч определяли ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток.

В табл. 10 выше суммировано воздействие композиций трепростинила на пролиферацию клеток NR8383. Все композиции трепростинила продемонстрировали некоторое ($\leq 10\%$) ингибирование пролиферации клеток NR8383.

Пример 6. Соединения трепростинила *in vivo*.

Эффект соединений, являющихся производными трепростинила, *in vivo* определяли, используя крысиные модели. Для этого исследования использовали молодых самцов крыс Sprague Dawley (Charles River). Крыс анестезировали кетамин/ксилазином, размещали на грелке-подстилке и после хирургического изолирования и катетеризации трахеи механически вентилировали на всем протяжении исследования.

В бедренной артерии устанавливали катетер для измерения систолического (sys) и диастолического (dias) давления крови. Выполняли торакотомию, и в правый желудочек вставляли катетер и позиционировали его в легочной артерии для измерения легочного артериального систолического и диастолического давления крови. Насыщение кислородом (SaO₂) измеряли пульсовым оксиметром, размещенным на лапе.

У крыс, вентилируемых на окружающем воздухе (FIO₂=0,21), сердечно-сосудистые измерения производили в этих условиях нормального содержания кислорода. Чтобы вызвать гипоксию FIO₂ снижали в течение периода времени 30 мин до тех пор, пока SaO₂ не падала до значений 50-60%, и определяли исходный показатель гипоксии.

Группы по четыре крысы в каждой получали либо PBS, либо свободный трепростинил (1,7 и 10 мкг/кг), либо композицию, содержащую C₂-TR (T554); C₈-TR (T555: 40 мол.% C₈-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) (38,6 мкг/кг), C₁₀-TR (T556: 40 мол.% C₁₀-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC) (40,8 мкг/кг), C₁₂-TR (T568).

Целевая доза слегка варьировала по массе из-за различий в молекулярной массе композиций производных трепростинила, как показано в табл. 11 ниже. Фактическая достигнутая легких доза была примерно в 5 раз ниже, чем указанная в табл. 11 (например, введение 10 мкг/кг давало примерно 2 мкг/кг в легких). Различные терапевтические средства доставляли (ингаляцией распыленного лекарственного средства) в легкие крыс. Легочное артериальное давление (PAP), системное артериальное давление (SAP) и частоту сердечных сокращений у крыс измеряли непрерывно в течение 180 мин. Сигнал PAP регистрировали при 200 точках в секунду.

Таблица 11
Целевые дозы в крысиной модели острой гипоксии

		Целевая доза (мкг/кг)	Целевая доза (нмоль/кг)
Трепростинил		1,7	4,35
		10	25,6
		30	76,8
Соединение, являющееся производным трепростинила	C ₂ [*]	32,1	76,8
	C ₆ [*]	36,4	76,8
	C ₈ [*]	38,6	76,8
	C ₁₀ [*]	40,8	76,8
	C ₁₂ [*]	42,9	76,8
	C ₁₆ [*]	47,2	76,8

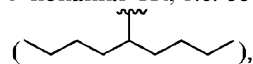
* - означает длину алкильной цепи в положении R₂ соединения формулы (A).

Нормализованное варьирование среднего РАР (mPAR) представлено в процентах от гипоксического исходного значения при (T=0) на фиг. 15. Гипоксическое исходное значение РАР составляло 100%, и изменения давления измеряли в сравнении с гипоксическим исходным значением. Нормализованное варьирование среднего SAP (mSAP) представлено в процентах от гипоксического исходного значения на фиг. 16. Частота сердечных сокращений представлена на фиг. 17 в процентах от гипоксического исходного значения с течением времени.

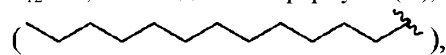
Пример 7. Измерение уровней циклического аденозинмонофосфата (сAMP) в клетках CHO-K1 в ответ на 5-нонанил-TR.

Анализ на клетках яичника китайского хомячка K1 (CHO-K1) на основе анализа сAMP GloSensor™ (Promega) использовали, как описано выше в примере 4, чтобы охарактеризовать воздействие на уровни сAMP следующих соединений:

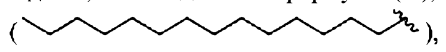
5-нонанил-TR, т.е. соединение формулы (A), где R₂=5-нонанил



C₁₂-TR, т.е. соединение формулы (A), где R₂=C₁₂ алкил



C₁₄-TR, т.е. соединение формулы (A), где R₂=C₁₄ алкил



C₁₆-TR, т.е. соединение формулы (A), где R₂=C₁₆ алкил



Клетки CHO-K1, котрансфицированные рецептором EP2 и плазмидой GloSensor™, стимулировали 5-нонанил-трепростинилом (разветвленная цепь, 5C9-TR) или соединениями, представляющими собой алкиловые сложные эфиры трепростинила, имеющими C₁₂, C₁₄ или C₁₆ прямоцепочечную алкильную группу в положении группы R₂ вышеуказанного соединения. Уровни сAMP затем измеряли каждые 5 мин на протяжении 8 ч. Кривые доза-ответ за периоды времени инкубирования 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 ч для 5-нонанил-TR, C₁₄-TR и C₁₆-TR представлены на фиг. 18, 19 и 20 соответственно. Подобно C₁₄-TR и C₁₆-TR сила действия 3-нонанил-TR увеличивается с увеличением времени инкубирования, что указывает на профиль замедленного высвобождения. Полумаксимальные эффективные концентрации (EC₅₀) соединений трепростинила определяли, используя результаты анализов сAMP. EC₅₀ для 5-нонанил-TR, C₁₄-TR и C₁₆-TR представлены на фиг. 18, 19 и 20 соответственно.

Результаты по кинетическому профилю при 10 мкМ (верхняя панель) и 5 мкМ (нижняя панель) концентрациях C₁₂-TR, C₁₄-TR C₁₆-TR или 5-нонанил-TR представлены на фиг. 21. Уровни сAMP в ответ на C₁₂-TR, C₁₄-TR и 5-нонанил-TR при обеих концентрациях увеличивались за первые 1-1,5 ч и поддерживались в течение по меньшей мере 8 ч. Ранжирование по активности соединений трепростинила было следующим: C₁₂-TR > C₁₄-TR > 5-нонанил-TR > C₁₆-TR.

Результаты исследования показали, что подобно алкиловым сложным эфирам трепростинила, имеющим C₁₂, C₁₄ или C₁₆ прямоцепочечную алкилэфирную группу, 5-нонанил-TR является функциональным и проявляет длительную активность в отношении сAMP. Таким образом, в отличие от свободного трепростинила (см. пример 4) 5-нонанил-TR имеет профиль замедленного высвобождения.

Пример 8. Сравнение активации циклического аденозинмонофосфата (сАМР) в клетках CHO-K1 в ответ на композиции C₁₄-TR.

Анализ на клетках яичника китайского хомячка K1 (CHO-K1) на основе анализа сАМР GloSensor™ (Promega) использовали, как описано в примере 4, чтобы охарактеризовать воздействие разных композиций C₁₄-TR на уровни сАМР. Композиции C₁₄-TR приведены ниже в табл. 12. Композиция T679 не содержит DOPC; композиция T647 не содержит DOPC или сквалан.

Структура C₁₄-TR следующая:

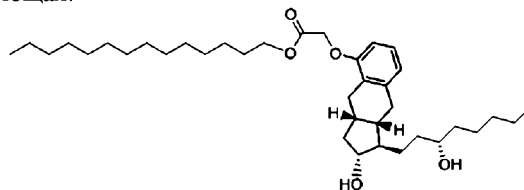


Таблица 12

Компоненты композиций C₁₄-TR

Композиция	C _x -TR (мол.%)	Гидрофобная добавка (мол.%)	РЕГирированный липид (мол.%)	DOPC мол.%
T631	C ₁₄ -TR (40%)	Сквалан (40%)	Chol-PEG2k (10%)	10%
T679	C ₁₄ -TR (45%)	Сквалан (45%)	Chol-PEG2k (10%)	0
T647	C ₁₄ -TR (90%)	(нет)	Chol-PEG2k (10%)	0

Клетки CHO-K1, котрансфицированные рецептором EP2 и плазмидой GloSensor™, стимулировали композициями алкилового сложного эфира трепростинила с C₁₄ прямоцепочечной алкилэфирной группой в положении карбоновой кислоты, имеющими компоненты, указанные в табл. 12. Уровни сАМР затем измеряли каждые 5 мин за период времени 8 ч.

Кривая доза-ответ за периоды времени инкубирования 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 ч для соединения T679 представлена на фиг. 22. Сила действия T679 увеличивается с течением времени инкубирования, что указывает на профиль замедленного высвобождения. Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) T679 определяли, используя результаты анализов сАМР, и эти данные также представлены на фиг. 22.

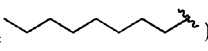
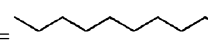
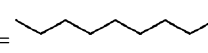
Сравнение кинетических профилей для свободного трепростинила, T631 и T679 при 10 мкМ (верхняя панель) и 5 мкМ (нижняя панель) представлены на фиг. 23. T631 и T679 оба менее сильнодействующие по сравнению со свободным трепростинилом. Однако в отличие от трепростинила активация сАМР увеличивалась с течением времени в ответ как на T631, так и на T679 и продолжалась в течение по меньшей мере 8 ч. Результаты исследования показали, что композиция T679, которая представляет собой C₁₄-TR без DOPC, является функциональной и проявляет профиль замедленного высвобождения, подобный профилю C₁₄-TR T631.

Кривая доза-ответ за периоды времени инкубирования 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 ч для соединения T647 представлена на фиг. 24. Подобно T679 сила действия T647 увеличивается с увеличением времени инкубирования, что указывает на профиль замедленного высвобождения. Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) T647 определяли, используя результаты анализа сАМР, и эти данные представлены на фиг. 24.

Сравнение кинетического профиля для свободного трепростинила, T631 и T647 при 10 мкМ (верхняя панель) и 5 мкМ (нижняя панель) представлено на фиг. 25. T631 и T647 оба были менее сильнодействующими по сравнению со свободным трепростинилом. Однако в отличие от свободного трепростинила активация сАМР увеличивалась с течением времени в ответ как на T631, так и на T647 и продолжалась в течение по меньшей мере 8 ч. Результаты исследования показали, что композиция T647, которая представляет собой C₁₄-TR без DOPC или сквалана, является функциональной и демонстрирует профиль замедленного высвобождения, подобный профилю C₁₄-TR T631.

Пример 9. Функциональные сАМР исследования для композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме наночастиц.

Анализ на клетках яичника китайского хомячка K1 (CHO-K1) на основе анализа сАМР GloSensor™ (Promega) использовали, как описано в примере 4, чтобы охарактеризовать воздействие композиции трепростинила на уровни сАМР. В этом исследовании тестировали сАМР профили следующих композиций трепростинила (см. также табл. 13):

- T555: C₈-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
- T556: C₁₀-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
- T568: C₁₂-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,

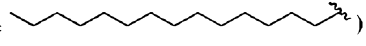
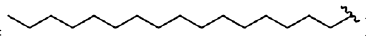
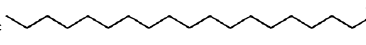
T631: C₁₄-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
 T623: C₁₆-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
 T637: C₁₈-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=.

Таблица 13

Композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила, использованных в примере 9

Композиция №	Алкиловый сложный эфир трепростинила (Cx-TR*)	Алкиловый сложный эфир трепростинила (мол %)	Сквалан (мол %)	DOPC (мол.%)	Chol-PEG2k (мол.%)
T555	C ₈ -TR	40	40	10	10
T556	C ₁₀ -TR	40	40	10	10
T568	C ₁₂ -TR	40	40	10	10
T631	C ₁₄ -TR	40	40	10	10
T623	C ₁₆ -TR	40	40	10	10
T637	C ₁₈ -TR	40	40	10	10

*Cx означает длину алкильной цепи в положении R₂ соединения формулы (A).

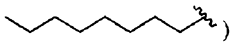
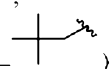
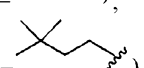
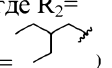
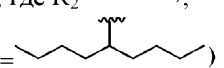
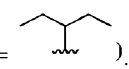
Клетки CHO-K₁ котрансфицированные рецептором EP2 и плазмидой GloSensor™, стимулировали композициями алкиловых сложных эфиров трепростинила, перечисленными выше. Уровни cAMP затем измеряли каждые 5 мин на протяжении периода времени 8 ч.

Кривая доза-ответ за периоды времени инкубирования 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 ч для композиции T637 (C₁₈-TR) представлена на фиг. 26. Сила действия T679 увеличивается в течение начального периода времени инкубирования, а затем остается на одном уровне в течение по меньшей мере 8 ч, что свидетельствует о профиле замедленного высвобождения. Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) T637 определяли, используя результаты анализов cAMP, и она также представлена на фиг. 26.

Сравнение кинетических профилей для свободного трепростинила, T555, T556, T568, T631, T623 и T637 при 10 мкМ (верхняя панель) и 5 мкМ (нижняя панель) представлены на фиг. 27. Каждое из соединений, представляющих собой алкиловый сложный эфир трепростинила, было менее сильнодействующим по сравнению со свободным трепростинилом. Однако в отличие от свободного трепростинила активация cAMP увеличивалась и затем оставалась на постоянном уровне в течение по меньшей мере 8 ч в ответ на каждый алкиловый сложный эфир трепростинила, и это указывает на то, что эти соединения являются функциональными и проявляют профиль замедленного высвобождения. Ранжирование по порядку активности для этих соединений следующее: T555/T556>T568>T631>T623>T637.

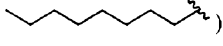
Пример 10. Кинетика ферментативного превращения разветвленных соединений трепростинила.

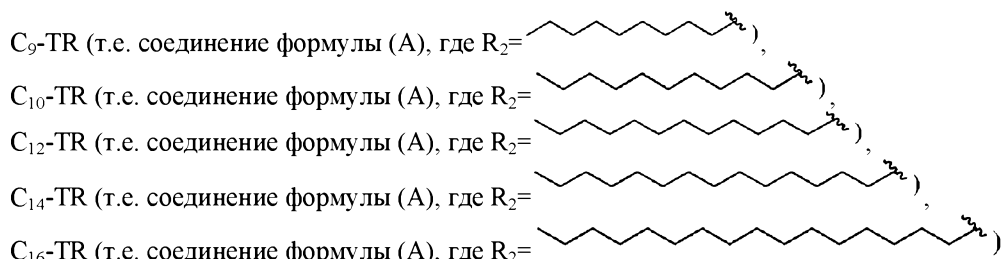
Ряд исследований проводили для определения кинетики превращения линейных соединений трепростинила в трепростинил по сравнению с различными разветвленными соединениями трепростинила. 0,4 мМ линейного C₈-TR или разветвленных соединений трепростинила 2-диметил-1-пропанил-TR, 3,3-диметил-1-бутанил-TR, 2-этил-1-бутанил-TR, 5-нонанил-TR или 3-пентанил-TR (смотри структуры ниже) инкубировали с 0,2 ед. эстеразы при 37°C в течение 1 ч, и превращение (% от общего) вычисляли при времени инкубирования 0,25, 0,5, 0,75 или 1 ч.

C₈-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
 2-диметил-1-пропанил-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
 3,3-диметил-1-бутанил-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
 2-этил-1-бутанил-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
 5-нонанил-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=,
 3-пентанил-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=.

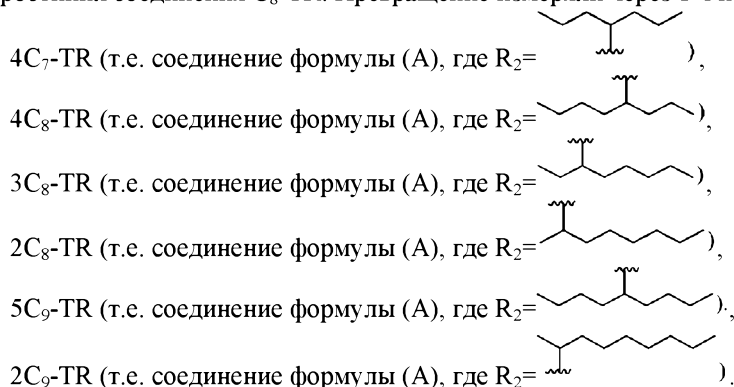
На фиг. 28 показано, что 5-нонанил-TR демонстрирует более низкую степень превращения, чем линейный C₈-TR.

На фиг. 29 представлено эстеразаопосредованное превращение в трепростинил следующих соединений трепростинила: C₈-TR, C₉-TR, C₁₀-TR, C₁₂-TR, C₁₄-TR и C₁₆-TR, т.е. где R₂ имеет указанную формулу. Превращение представлено по сравнению с соединением C₈-TR, и превращение измеряли через 1 ч после инкубирования с эстеразой.

C₈-TR (т.е. соединение формулы (A), где R₂=.



На фиг. 30 представлено эстеразаопосредованное превращение в трепростинил разветвленных соединений трепростинила (указанных ниже) по сравнению с эстеразаопосредованным превращением в трепростинил соединения C₈-TR. Превращение измеряли через 1 ч после инкубирования с эстеразой.



Каждое из разветвленных соединений 4C₇-TR, 4C₈-TR и 5C₉-TR продемонстрировало более низкую скорость превращения, чем линейное соединение C₈-TR. Асимметрическое разветвленное соединение (4C₈-TR) продемонстрировало более низкую скорость превращения, чем симметрические соединения (4C₇-TR и 5C₉-TR). Кроме того, не было никакой существенной разницы между скоростями превращения R- и S-изомеров 2C₈-TR ((R)-2C₈-TR относительно (S)-2C₈-TR).

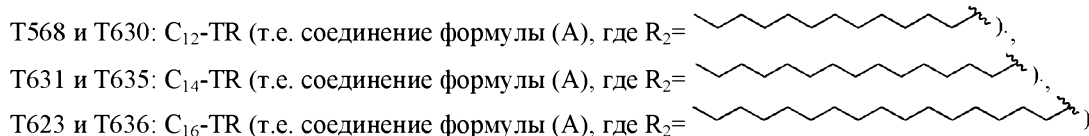
Пример 11. Измерение фармакокинетики трепростинила у крыс.

В табл. 14 представлены композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила, использованные в данном исследовании. Предполагается, что первые три композиции (T568, T631 и T623) образуют липидные наночастицы, а последние три композиции (T630, T635 и T636) образуют мицеллы.

Таблица 14

Композиции алкиловых сложных эфиров, использованных в примере 11

Композиция №	Алкиловый сложный эфир трепростинила	Алкиловый сложный эфир трепростинила (мол.%)	Сквалан (мол.%)	DOPC (мол.%)	Chol-PEG2k (мол.%)	DMPE-PEG2k (мол.%)
T568	C ₁₂ -TR	40	40	10	10	—
T631	C ₁₄ -TR	40	40	10	10	—
T623	C ₁₆ -TR	40	40	10	10	—
T630	C ₁₂ -TR	10	—	—	—	90
T635	C ₁₄ -TR	5	—	—	—	95
T636	C ₁₆ -TR	5	—	—	—	95



Распыленный раствор трепростинила (TRE) и композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила вводили (в дозе 15 нмоль/кг или 6 мг/кг экв. TRE) анестезированным и вентилируемым крысам (6-часовые исследования) или находящимся в сознании крысам ингаляцией только через нос (24-часовые исследования). Образцы крови и легких собирали в конкретно установленные моменты времени. Концентрации TRE и алкиловых сложных эфиров трепростинила в плазме крови и в ткани легких измеряли методом анализа HPLC/MS/MS (высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия).

Анестезированные, вентилируемые крысы.

Самцов крыс Sprague Dawley анестезировали и устанавливали им эндотрахеальную трубку для вентилиции. В вену правого желудочка вставляли канюлю для облегчения отбора образцов крови. Терминальные образцы легкого брали для анализа только через 6 ч после введения дозы. Небулайзер Aeroneb®

и контроллер (Aerogen, Galway, Ireland) использовали для продуцирования аэрозоля с масс-медианным аэродинамическим диаметром (MMAD) от 2,5 до 4 мкм и со скоростью 0,1 мл/мин для обеспечения установленной легочной дозы 6 мкг/кг. Малый вентилятор для животных SAR-830/AP (CWE Inc., Ardmore, PA), установленный на дыхательный объем (VT) 8 мл/кг, скорость 90 вдохов/мин, использовали для доставки распыленных тестируемых веществ объемом 250 мкл. Измеряли системное давление крови (mSAP), частоту сердечных сокращений (HR) и артериальное насыщение кислородом (SaO₂). Физиологические параметры измеряли во время нормоксии (доля вдыхаемого кислорода [FrO₂]=0,21, SaO₂≈90%) и в течение 2-3 ч во время гипоксии (FrO₂=0,10, SaO₂≈50%).

Ингаляция только через нос в сознании.

Самцов крыс Sprague Dawley размещали в удерживающих трубках и подвергали воздействию лекарственных средств через ингаляционную систему с направленным потоком только в нос Jaeger-NYU (CH Technologies, Westwood, NJ) (Фиг. 31). Тестируемые вещества (6 мл при конкретной концентрации) распыляли, используя небулайзер Aeroneb для доставки предопределенной установленной легочной дозы. Образцы крови и ткани легких брали в выбранные моменты времени после распыления лекарственных средств в течение 24-часового периода времени.

Вентилируемые крысы, которых обрабатывали распыленным раствором TRE, имели наивысшую концентрацию в плазме крови (C_{max}) (3,5 нг/мл), которая имела место сразу после введения дозы (фиг. 32, слева). Измеримые уровни TRE не наблюдались после 4 ч в плазме крови и к 6 ч в легких. Напротив, вентилируемые крысы, которых обрабатывали распыленными TPD-LNP (липидными наночастицами пролекарства трепростинила), имели более низкие значения C_{max} TRE в плазме крови, в пределах от 0,2 до 0,6 нг/мл (табл. 15, фиг. 32 слева). Через 6 ч алкиловый сложный эфир трепростинила оставался в легком на уровнях в пределах от 100 до 400 нг/г ткани эквивалента TRE (фиг. 33). Предполагается, что трепростинил, обнаруженный в легком, образовался вследствие гидролиза алкилового сложного эфира трепростинила во время приготовления образца. При введении дозы мицеллярного TPD уровни TRE в плазме крови были выше, чем с композициями TPD в форме липидных наночастиц, что свидетельствует о том, что наночастицы играют дополнительную роль в эффекте медленного высвобождения (фиг. 32, сравнение левого и правого графиков). В 24-часовых исследованиях у крыс, которым вводили дозы композиций TPD в форме липидных наночастиц (ингаляция только через нос), C_{max} TRE была выше, чем у вентилируемых животных, и показала почти экспоненциальное падение первого порядка. Концентрации TRE в плазме крови у крыс, которые получали дозу композиций C₁₄- и C₁₆-алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме липидных наночастиц, поддерживались на уровне более 0,1 нг/мл вплоть до 24 ч (уровни, соответствующие активности в исследованиях острой гипоксии) (фиг. 34, сверху). Уровни в легких суммарно TRE+TPD были приблизительно в 10³ выше, чем TRE в плазме крови и также демонстрировали экспоненциальное падение у крыс, которым вводили композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме липидных наночастиц (фиг. 34, внизу). В табл. 16 дополнительно представлена фармакокинетика трепростинила у крыс после введения с использованием системы только через нос распыленных композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме липидных наночастиц в установленной легочной дозе 6 мкг/кг. На фиг. 35 также показано, что кинетика высвобождения трепростинила из ингалируемых композиций C₁₆-TR на протяжении 24 ч не зависит от дозы (дозирование только через нос). Время на фиг. 35 соответствует времени после начала распыления, 6 мл суспензии (период распыления составлял от 30 до 60 мин). На фиг. 38 показано, что животные, которых лечили T568 и T623, имели преимущественное выживание (выживание свыше 200 мин) по сравнению с животными, которых лечили свободным трепростинилом или PBS. Конкретно, на фиг. 38 представлено легочное артериальное давление у животных, которых лечили различными композициями в форме липидных наночастиц, PBS и трепростинилом. Кроме того, обработка T568 и T623 показала незначительное воздействие на системную гемодинамику (фиг. 39). Наконец, было показано, что композиции алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме наночастиц медленно превращаются в трепростинил, обеспечивая постоянные уровни в плазме крови с пониженными максимальными значениями (фиг. 40).

Таблица 15

Фармакокинетика в плазме трепростинила у вентилируемых крыс после введения дозы распыленного раствора трепростинила или композиции алкилового сложного эфира трепростинила в форме суспензии в установленной легочной дозе 6 мкг/кг

	Раствор	Липидные наночастицы (T568, T631 и T623)			Мицеллы (T630, T635 и T636)		
		T568 (C ₁₂ -TR)	T631 (C ₁₄ -TR)	T623 (C ₁₆ -TR)	T630 (C ₁₂ -TR)	T635 (C ₁₄ -TR)	T636 (C ₁₆ -TR)
AUC 0-6 ч (нг*ч/мл)	2,13	4,47	3,89	1,84	9,72	9,11	5,35
C _{max} (нг/мл)	3,37	0,56	0,34	0,22	2,40	1,20	0,84
T _{max} (ч)	0,05	0,5	0,5	1,0	0,05	0,5	1,0

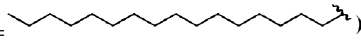
Таблица 16

Фармакокинетика трепростинила у крыс после введения доз с использованием системы только в нос распыленных композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила (T568, T631 и T623) в установленной легочной дозе 6 мкг/кг

Соединение	C ₁₂ -TR	C ₁₄ -TR	C ₁₆ -TR
Сразу после введения дозы (IPD) (мкг/кг)	6,2	10,4	17,9
Кажущаяся скорость выведения из легких (ч ⁻¹)	0,42	0,15	0,10
Максимальная концентрация в плазме крови (C _{max}) IPD (нг/мл)	4,03	4,93	3,46
Кажущаяся скорость выведения из плазмы крови (ч ⁻¹)	0,30	0,18	0,14
Площадь под кривой (AUC) 1-24 (нг*ч/мл)	11,9	24,0	17,9

Ингалируемые TPD присутствуют в легких в течение длительного срока действия, и это связано с медленным, длительным высвобождением TRE в кровь. Эта продолжительность активности увеличивается с использованием TPD, приготовленными в форме липидных наночастиц.

Пример 12. Фармакокинетический профиль композиции алкилового сложного эфира C₁₆-TR в форме липидных наночастиц у собак.

Двенадцати гончим собакам обоих полов рандомизированно были назначены разные ингалируемые дозы трепростинила в PBS или соединения формулы (A), где R₂=  (C₁₆-TR), в составе композиции в форме липидных наночастиц (T623), которая суспендирована в PBS (см. и табл. 14), которые оба вводили небулайзером. Композиции распыляли небулайзером Aeroneb (MMAD: 2,5-4 мкм) вставленным в 500 мл расширительную камеру. Композиции распыляли в течение 2 мин при установках вентилятора 90 мл/вдох, 15 вдохов/мин (доставляемый объем=2,7 л) и собирали на фильтре. Количество лекарственного средства (мкг) на фильтре измеряли методом HPLC для вычисления концентрации лекарственного средства, доставленного через канал вентилятора (мкг/л).

Дозиметрию осуществляли у собак, анестезированных пропофолом, которым распыленные лекарственные средства вводили в смесительную камеру, вставленную на дыхательную часть собачьего респиратора. Технические испытания проводили перед каждым экспериментом для измерения концентрации лекарственного средства (мкг/л), доставляемого при каждом вдохе. Дозу ингалируемого лекарственного средства (мкг/кг) вычисляли, используя следующую формулу:

Доза ингалируемого лекарственного средства (мкг/кг)=Концентрация лекарственного средства (мкг/л)×Вентиляция в минутах (л/мин)×Время (мин)/Масса тела (кг).

После доставки лекарственных средств собак отсоединяли от респиратора, и собирали образцы крови за период времени 72 ч для измерения концентраций трепростинила в плазме крови методом HPLC/MS/MS. На протяжении этого периода 72 ч осуществляли мониторинг клинических признаков.

Использование подхода с анестезией, интубированием и вентиляцией обеспечивало воспроизводимость между собаками для достижения направленной доставки ингалируемой дозы как для трепростинила (5±1 и 16±2 мкг/кг), так и для C₁₆-TR (7±1, 22±1, 46±1 и 95±1 мкг/кг). При ингалируемых дозах 5 и 16 мкг/кг значения C_{max} трепростинила в плазме крови у собак, которым вводили трепростинил (2,7 и 5,9 нг/мл соответственно), были в 15-20 раз выше по сравнению с уровнями трепростинила, достигаемыми при введении аналогичных ингалируемых доз (7 и 22 мкг/кг) C₁₆-TR в композиции T623 (0,2 и 0,3 нг/мл соответственно) (фиг. 36). Кроме того, уровни трепростинила в плазме крови поддерживались на протяжении 48-часового периода при ингаляции T623, но исчезали в пределах нескольких часов после ингаляции трепростинила (фиг. 36). Кашель и быстрое поверхностное дыхание отсутствовали во время доставки трепростинила анестезированным, вентилируемым собакам, но присутствовали в период восстановления. У собак, получавших T623, отсутствовали признаки респираторного раздражения при таких высоких ингалируемых дозах, как 46 мкг/кг.

Сравнение композиции C₁₆ алкилового сложного эфира трепростинила в форме липидных наночастиц с композициями C₁₂ и C₁₄ алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме липидных наночастиц.

Двенадцать гончих собак подвергали воздействию ингалируемых трепростинила и трех композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила в форме липидных наночастиц: T568 (додецил-трепротинил, C₁₂-TR), T631 (тетрадецил-трепротинил, C₁₄-TR) и T623 (гексадецил-трепротинил, C₁₆-TR). Компоненты каждой композиции представлены в табл. 14 выше.

Дозиметрию осуществляли у собак, анестезированных пропофолом, искусственно вентилируемых, которым распыленные лекарственные средства вводили в смесительную камеру, вставленную на дыхательную часть собачьего респиратора. Технические испытания проводили перед каждым экспериментом для измерения концентрации лекарственного средства (мкг/л) на каждый вдох, минутного объема вентиляции легких и времени, необходимого для достижения целевой легочной дозы. После выхода из наркоза собирали образцы крови за период времени 72 ч и измеряли уровни TRE в плазме крови методом HPLC/MS/MS. Также осуществляли мониторинг клинических признаков (кашель, быстрое поверхност-

ное дыхание, рвота и бледные десны).

При целевой легочной дозе 18 мкг/кг уровни трепростинила в плазме крови были наивысшими для свободного трепростинила ($C_{\max}=5,9\pm0,6$ нг/мл) сразу после введения дозы, но соответствующие значения $C_{\max}$ для C_{12} -TR, C_{14} -TR и C_{16} -TR были в 5, 13 и 20 раз ниже. Уровень трепростинила в плазме крови был ниже уровня количественного определения в течение 4 ч после ингаляции свободного трепростинила, но поддерживался в течение 48-72 ч после ингаляции композиций алкиловых сложных эфиров трепростинила.

Дозазависимые увеличения $C_{\max}$ и AUC наблюдались при ингаляции C_{16} -TR (6-90 мкг/кг) с пролонгированным присутствием трепростинила в плазме крови в течение вплоть до 72 ч в высших дозах. Неблагоприятные клинические признаки наблюдались в случае трепростинила и C_{12} -TR в целевой дозе 18 мкг/кг, но не C_{14} -TR и C_{16} -TR. В исследовании зависимости доза-ответ с C_{16} -TR неблагоприятные клинические признаки наблюдались только у 1 собаки при целевой легочной дозе 90 мкг/кг.

На основе этого РК исследования у собак ингалируемый C_{16} -TR в композиции в форме наночастиц обеспечивает длительное присутствие трепростинила в плазме и более низкий потенциал побочных эффектов, чем ингалируемый свободный трепростинил в сравнимых дозах.

Пример 13. Определение характеристик композиции C_{16} алкилового сложного эфира трепростинила в форме липидных наночастиц.

Определяли характеристики T748, композиции C_{16} алкилового сложного эфира трепростинила в форме липидных наночастиц, имеющей следующие компоненты:

C_{16} -TR (мол.%)	Сквалан (мол.%)	DSPE- PEG2k (мол.%)
45	45	10

Оценка переносимости и фармакокинетики (РК) трепростинила у крыс, которым вводили композицию T748 в форме липидных наночастиц.

Чтобы оценить, хорошо ли переносится повторное введение ингалируемого C_{16} -TR и изменяется ли РК, крыс подвергали воздействию C_{16} -TR в течение 14 последовательных дней.

5 групп (n=4 на группу) крыс Sprague Dawley подвергали воздействию ингалируемого забуференного фосфатами физиологического раствора (PBS) или 4 доз C_{16} -TR (0,6, 1,8, 6 и 18 мкг/кг), вводимых распылением в камере для ингаляции только через нос. Когорты крыс исследовали после введения 1, 7 и 14 ежедневных ингалируемых доз C_{16} -TR, образцы крови собирали через 1, 3, 6 и 24 ч, и легкие собирали через 24 ч после последней дозы лекарственного средства. Концентрации трепростинила и C_{16} -TR в плазме и легких измеряли методом HPLC/MS/MS. Массы тел регистрировали ежедневно, и массы органов (легкие, сердце, печень) измеряли через 24 ч после последней дозы лекарственного средства.

Никаких проблем переносимости или значительных изменений (по сравнению с PBS) масс тел и масс органов после ингаляции C_{16} -TR в течение 14 последовательных дней не наблюдалось. Увеличение ингалируемых доз C_{16} -TR (0,6-18 мкг/кг) повышало $C_{\max}$ и AUC в плазме крови, но это не обязательно происходило при повторном введении доз. Была некоторая вариабельность AUC между днями 1 и 14 в разных группах дозирования с 2 из 4 доз (1,8 и 18 мкг/кг), показывающая отсутствие разницы, и остальными 2 дозами (0,6 и 6 мкг/кг), показывающими 3-4-кратное увеличение AUC в день 14. Присутствие C_{16} -TR не обнаруживали в плазме при всех дозах. Однако относительно высокие концентрации C_{16} -TR (приблизительно в 1000 раз выше, чем трепростинил в плазме крови) были обнаружены в легких. Ингалируемый C_{16} -TR давал дозозависимое увеличение концентрации C_{16} -TR в легких, но оно не изменялось при повторном дозировании в течение 14 последовательных дней.

Ингалируемый C_{16} -TR (0,6-18 мкг/кг) хорошо переносился без признаков изменения массы тела и массы органов после введения доз в течение 14 последовательных дней.

Воздействие C_{16} композиции алкилового сложного эфира трепростинила в форме липидных наночастиц на кашлевой рефлекс у морских свинок.

В этом исследовании сопровождаемые кашлем эффекты ингалируемого трепростинила и композиции алкилового сложного эфира гексадецил-трепростинила (C_{16} -TR) в форме липидных наночастиц исследовали у морских свинок.

Три группы самцов морских свинок Dunkin Hartley размещали в плетизмографе для плетизмографии всего тела и подвергали воздействию аэролизированного забуференного фосфатами физиологического раствора (PBS), TRE (1-300 мкг/мл) и композиции в форме липидных наночастиц C_{16} -TR T748 (30 мкг/мл) соответственно. T623 имеет следующие компоненты.

Аэрозоли генерировали небулайзером Ultra-Neb Pro (выброс из небулайзера 0,36 мл/мин), и аэрозоль смешивался с вдыхаемым воздухом, доставляемым со скоростью 2 л/мин. PBS или лекарственные средства доставляли в течение 10 мин, и количество кашлей регистрировали во время доставки и в течение 20 мин после доставки. Кашли детектировали визуальными наблюдениями, записями плетизмографа и звуками кашля.

Воздействие аэрозолизированного PBS не вызывало кашля. Воздействие TRE равным образом не вызывало кашля у тестируемых животных, пока воздействующая концентрация не становилась равной или больше 30 мкг/мл. Кашлевая реакция характеризовалась приступами очень частого кашля с пониженными звуками кашля по сравнению с типичным звуком кашля, вызываемым лимонной кислотой или капсаицином. TRE в распыляемой концентрации 30 мкг/мл вызывал стойкий кашель у 7 из 7 морских свинок с 1-4 приступами кашля и общим количеством кашлей в среднем 36 ± 9 кашлей. Напротив, ингалируемая композиция C_{16} -TR в форме наночастиц в распыляемой концентрации 30 мкг/мл не вызывала кашель, ни одного эпизода не наблюдалось у 6 из 6 морских свинок.

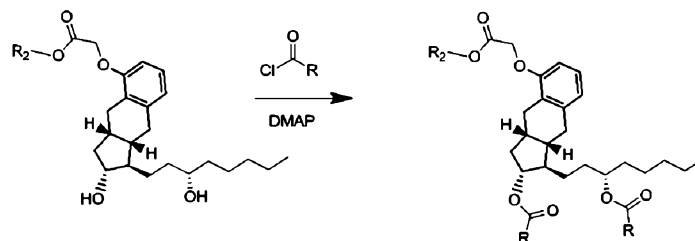
Результаты этого исследования продемонстрировали, что TRE вызывает у морских свинок кашель, профиль которого является до некоторой степени аналогичным профилю, описанному ранее (кашель типа II) с использованием ингалируемых простагландинов у морских свинок (Maher and Belvisi, 2010). С другой стороны, ингалируемая композиция в форме липидных наночастиц C_{16} -TR не вызывала кашель, и это свидетельствует о том, что эта композиция может исключать некоторые локальные неблагоприятные побочные эффекты, такие как кашель, наблюдаемый при терапии ингалируемым TRE у людей.

Пример 14. Ацилирование производных трепростинила.

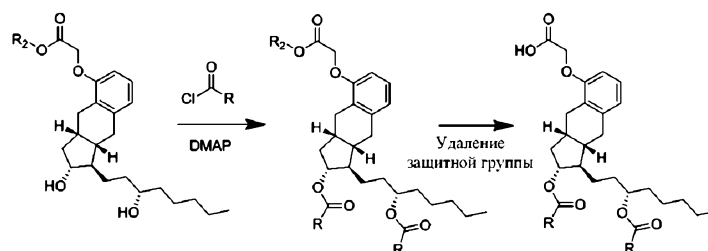
Трепростинил или сложноэфирные производные трепростинила (например, дериватизированные алкильными или алкенильными группами по карбоновокислотной группировке, которые получены в примере 1) ацилировали следующим образом:

Соединение примера 1 (0,05 моль) или трепростинил растворяют в 10 мл дихлорметана при 0°C. Добавляют диметиламинопиридин (20 мол.%) и затем добавляют раствор ацилхлорида $R(CO)Cl$ (2,1 экв.) при 0°C (где R представляет собой R_5 или R_6 , которые описаны в данном документе) к соединению примера 1 или трепростинилу. Раствор перемешивают и оставляют нагреваться до 23°C в течение 1 ч. Реакцию контролируют тонкослойной хроматографией, и когда никаких изменений не наблюдается, реакцию гасят $NaHCO_3$ (нас), и погашенную смесь экстрагируют дихлорметаном (3×10 мл). Объединенные органические экстракты сушат над безводным сульфатом натрия, и растворитель удаляют в вакууме с получением неочищенного продукта. Очистку осуществляют колоночной хроматографией на силикагеле с использованием 2%-ного метанола в дихлорметане.

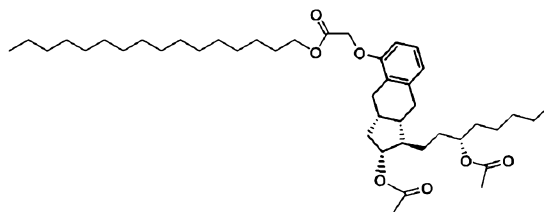
Общая схема синтеза ацилированных производных трепростинила приведена ниже (R_2 такой, как описано в данном документе, например представляет собой H или линейную или разветвленную алкильную группу)



Могут быть использованы другие методы ацилирования, известные в данной области, такие как селективное ацилирование каждого из вторичных спиртов. Кроме того, может быть выбран такой R_2 , чтобы группу R_2 можно было селективно удалить с соединения примера 11 после ацилирования вторичных гидроксильных функциональных групп. Стратегии использования защитных групп общеизвестны специалистам в данной области и описаны, например, в Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Edition, Wiley (2006), который во всей полноте для всех целей включен в данное описание посредством ссылки. Иллюстративная схема такого процесса представлена ниже



Синтез C_{16} TR-OAc



К раствору (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксиоктил]-1H-бенз[ф]инден-5-ил]окси]уксусной кислоты (трепростинил) (78,1 мг, 200 мкмоль), растворенной в 1,4-диоксане (2,0 мл), добавляли триэтиламин (TEA) (98 мкл, 700 мкмоль, 3,5 экв.), уксусный ангидрид (166 мкл, 1,760 мкмоль, 8,8 экв.) и каталитическое количество диметиламинопиридина (DMAP). Реакционную смесь встряхивали при 40°C в течение 72 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением густого бесцветного масла. Это неочищенное вещество растворяли в гексанах и промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (3×5 мл). Органические слои объединяли, и растворитель удаляли, используя слабый поток теплого газа N_2 и небольшой нагрев с получением густого бесцветного масла. Это неочищенное вещество растворяли в смеси 20% $^n\text{PrOH}$ /гексаны, пропускали через шприц-фильтр 0,45 мкм и подвергали очистке препаративной HPLC. Растворитель удаляли из очищенного вещества, используя слабый поток теплого газа N_2 и небольшой нагрев с получением густого бесцветного масла. Чистое вещество суспендировали в этиллактате для хранения и подвергали аналитической HPLC для определения концентрации.

C_{16} -TR-OAc: общий выход 73%. Соединение характеризовали методом ЯМР-спектроскопии:

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 0.89 (t, $J=7.0$ Гц, 6H), 1.17-1.32 (m, 33H), 1.43-1.46 (m, 2H), 1.49-1.66 (m, 8H), 1.89-1.93 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.30-2.35 (m, 2H), 2.47 (dd, $J=14.5$ Гц, $J=6.0$ Гц, 1H), 2.55 (dd, $J=15.0$ Гц, $J=6.0$ Гц, 1H), 2.76 (d, of d, $J=14.5$ Гц, $J=6.0$ Гц, 1H), 2.90 (dd, $J=15.0$ Гц, $J=6.0$ Гц, 1H), 4.19 (t, $J=7.0$ Гц, 2H), 4.62 (s, 2H), 4.70-4.74 (m, 1H), 4.87 (p, $J=6.0$ Гц, 1H), 6.63 (d, $J=8.0$ Гц, 1H), 6.82 (d, $J=8.0$ Гц, 1H), 7.08 (t, $J=8.0$ Гц, 1H) млн^{-1} ; ^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3) δ 14.2, 14.3, 21.5 (2), 22.7, 22.9, 25.1, 26.0 (2), 28.3, 28.8, 29.4, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9, 31.9, 32.1, 33.6, 33.7, 34.3, 37.8, 40.7, 49.0, 65.6, 66.2, 74.6, 79.0, 109.8, 121.8, 126.4, 127.6, 140.7, 155.1, 169.6, 171.0, 171.1 млн^{-1} .

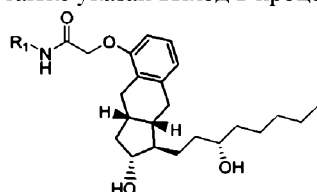
Пример 15. Синтез амидных производных трепростинила (сравнительных соединений).

Трепростинил коммерчески доступен и может быть синтезирован, например, способами, описанными в патентах США №№ 6765117 и 8497393. Синтез производных простагландина описан в патенте США № 4668814. Описания к патентам США №№ 6765117, 8497393 и 4668814 во всей их полноте для всех целей включены в данное описание посредством ссылки.

К раствору (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксиоктил]-1H-бенз[ф]инден-5-ил]окси]уксусной кислоты (т.е. трепростинила) (78,1 мг, 200 мкмоль), растворенного в 1,4-диоксане (2,0 мл), добавляли триэтиламин (TEA) (98 мкл, 700 мкмоль, 3,5 экв.), алкиламин $\text{R}_1\text{-NH}_2$ (240 мкмоль, 1,2 экв.) и раствор PyBOP (гексафторфосфат бензотриазол-1-илокситрис(пирролидин)фосфония) (364 мг, 700 мкмоль, 3,5 экв.) в 2,0 мл MeCN (ацетонитрила).

Реакционную смесь нагревали до 40°C и встряхивали при приблизительно 100 об/мин в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта в виде густого желтого масла. Этот продукт экстрагировали (жидкостная экстракция) из масла неоднократными промывками смесью 20% $^n\text{PrOH}$ /гексаны (3×3 мл). Растворитель удаляли из органического экстракта, используя слабый поток теплого газа N_2 и небольшой нагрев с получением густого желтоватого масла. Это неочищенное вещество растворяли в смеси 20% $^n\text{PrOH}$ /гексаны, пропускали через шприц-фильтр 0,45 мкм и подвергали очистке препаративной HPLC. Растворитель удаляли из очищенного вещества, используя слабый поток теплого газа N_2 и небольшой нагрев с получением густого бесцветного масла. Чистое вещество суспендировали в этиллактате для хранения и подвергали аналитической HPLC для определения концентрации.

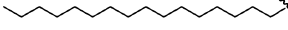
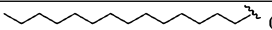
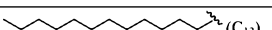
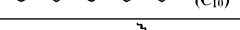
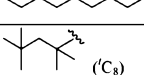
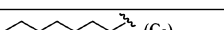
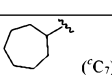
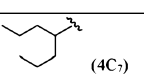
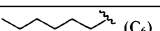
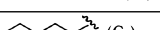
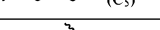
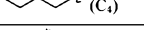
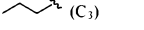
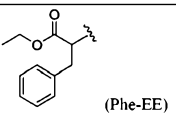
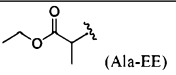
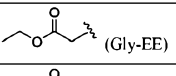
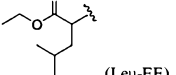
Указанные ниже амидные производные трепростинила формулы В были получены по схеме синтеза, приведенной выше. В табл. 17 также указан выход в процентах.



Формула (В)

Таблица 17

Амидные производные трепростинила

Группа R ₁	Выход	Сокращенное наименование соединения
R ₁ =  (C ₁₆)	88%	C ₁₆ -TR-A
R ₁ =  (C ₁₄)	71%	C ₁₄ -TR-A
R ₁ =  (C ₁₂)	57%	C ₁₂ -TR-A
R ₁ =  (C ₁₀)	62%	C ₁₀ -TR-A
R ₁ =  (C ₈)	47%	C ₈ -TR-A
R ₁ =  (C ₈)	72%	C ₈ -TR-A
R ₁ =  (C ₇)	50%	C ₆ -TR-A
R ₁ =  (C ₇)	62%	C ₇ -TR-A
Группа R ₁	Выход	Сокращенное наименование соединения
R ₁ =  (4C ₇)	65%	4C ₇ -TR-A
R ₁ =  (C ₆)	58%	C ₆ -TR-A
R ₁ =  (C ₅)	77%	C ₅ -TR-A
R ₁ =  (C ₄)	28%	C ₄ -TR-A
R ₁ =  (C ₃)	12%	C ₃ -TR-A
R ₁ =  (C ₂)	12%	C ₂ -TR-A
R ₁ =  (Phe-EE)	60%	Phe-EE-TR-A
R ₁ =  (Ala-EE)	Не определен	Ala-EE-TR-A
R ₁ =  (Gly-EE)	Не определен	Gly-EE-TR-A
R ₁ =  (Leu-EE)	Не определен	Leu-EE-TR-A

C₆-TR-A и C₁₂-TR-A характеризовали методом ЯМР-спектроскопии.

ЯМР-характеризация C₆-TR-A.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 0.90 (q, J=7.0 Гц, 6 H), 1.17 (q, J=12.0 Гц, 1H), 1.30-1.70 (m, 18 H), 1.81-1.83 (m, 1H), 1.80-1.93 (m, 1H), 2.20 (p, J=6.0 Гц, 1H), 2.22-2.23 (m, 1H), 2.47-2.54 (m, 2H), 2.75-2.82 (m, 2H), 3.16 (секстет, J=4.0 Гц, 1H), 3.35 (q, J=7.0 Гц, 2H), 3.63 (s, 1H), 3.70-3.80 (m, 1H), 4.48 (s, 2H), 6.55 (s, 1H), 6.70 (d, J=7.5 Гц, 1H), 6.85 (d, J=7.5 Гц, 1H), 7.11 (t, J=7.5 Гц, 1H) млн⁻¹; ¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ 14.2, 14.3, 22.8, 22.9, 25.6, 26.4, 26.7(2), 28.8, 29.7, 31.6, 32.1, 33.0, 33.8, 35.1, 37.7, 39.2, 41.4, 41.6, 46.5, 52.4, 68.4, 72.8, 110.4, 122.2, 126.8, 127.3, 141.2, 154.5, 168.7 млн⁻¹; HRMS (масс-спектрометрия высокого разрешения) (ESI (электрораспылительная ионизация), 2:2:1 MeCN, MeOH, H₂O): m/z=474,35717 ([M+H]⁺).

ЯМР-характеризация C₁₂-TR-A.

HRMS (ESI, 2:2:1 MeCN, MeOH, H₂O): m/z=558,45099 ([M+H]⁺).

Пример 16. Растворимость амидных производных трепростинила в гидрофторалкановых пропеллентах.

Выбранные производные трепростинила оценивали для использования в дозирующем ингаляторе (MDI). Четыре сложноэфирных производных, додецил-трепростинил (C₁₂-TR), тетрадецил-трепростинил (C₁₄-TR), гексадецил-трепростинил (C₁₆-TR) и нонанил-трепростинил с разветвленной цепью (5C9-TR) и два амидных производных, C₁₆-TR-A и C₁₂-TR-A (см. табл. 17), тестировали для определения растворимости в гидрофторалкановых пропеллентах HFA-134a и HFA-227 с добавлением этанола.

5 мг каждого соединения трепростинила добавляли в стеклянный сосуд. Добавляли конкретное

массовое количество этанола. К каждому сосуду прикручивали клапан MDI, через клапан добавляли HFA пропеллент до общего объема 5 мл. Соединения оставляли растворяться на 24 ч при комнатной температуре. Растворимость композиций оценивали визуально. Целью была оценка минимальной концентрации этанола, необходимой для растворения каждого соединения в пропелленте.

Растворимые образцы имели вид прозрачных и бесцветных растворов. В меньшей степени растворимые образцы имели тонкое кольцо от испарения жидкости разной плотности на поверхности сосуда на границе раздела жидкость-пар. Нерастворимые образцы имели образовавшийся белый осадок или кристаллы. Этанол добавляли в качестве вещества, способствующего растворению. Как можно видеть из таблиц растворимости, приведенных ниже (табл. 18 и 19), соединения, нерастворимые при добавлении 3%-ного этанола, становились растворимыми при добавлении 10%-ного или 13%-ного этанола.

Таблица 18

Таблица растворимости пролекарств трепростинила в HFA-134a с добавлением этанола

HFA-134a	C ₁₂ -TR	C ₁₄ -TR	C ₁₆ -TR	5C ₉ -TR	C ₆ -TR-A	C ₁₂ -TR-A
13% EtOH	S	S	R	S	n/e	n/e
10% EtOH	S	S	R	R	S	S
7% EtOH	S	R	R	R	R	R
5% EtOH	R	R	R	R	R	R
3% EtOH	R	R	n/e	R	R	P

S - растворимый; R - тонкое кольцо от испарения жидкости является видимым;
P - осадок является видимым; n/e - не оценивали.

Таблица 18

Таблица растворимости производных трепростинила в HFA-227 с добавлением этанола

HFA-227	C ₁₂ -TR	C ₁₄ -TR	C ₁₆ -TR	5C ₉ -TR	C ₆ -TR-A	C ₁₂ -TR-A
13% EtOH	S	n/e	S	S	n/e	n/e
10% EtOH	n/e	R	n/e	n/e	n/e	S
7% EtOH	n/e	R	R	R	R	R
5% EtOH	n/e	n/e	R	n/e	R	R
3% EtOH	R	R	n/e	R	R	P

S - растворимый; R - тонкое кольцо от испарения жидкости является видимым;
P - осадок является видимым; n/e - не оценивали.

Пример 17. Фармакокинетика трепростинила в плазме крови после ингаляции композиции C₁₂ амидсвязанного трепростинила в форме наночастиц у вентилируемых крыс.

Самцов крыс Sprague Dawley (N=3) анестезировали и вставляли им эндотрахеальную трубку для вентилиции. В правую бедренную вену вставляли канюлю для облегчения сбора крови. Крысам вводили композицию в форме липидных частиц T763, которая имеет следующие компоненты: (45 мол.% C₁₂-TR-A, 45 мол.% сквалана, 10 мол.% DSPE-PEG2000).

Небулайзер Aeroneb® и контроллер (Aerogen, Dangan, Galway, Ireland) использовали для создания аэрозоля с масс-медианным аэродинамическим диаметром (MMAD) от 2,5 до 4 мкм и со скоростью 0,1 мл/мин.

Малый вентилятор для животных SAR-830/AP (CWE Inc., Ardmore, PA), установленный на дыхательный объем вентилятора (VT) 8 мл/кг, скорость 90 вдохов/мин, использовали для доставки распыленных тестируемых веществ объемом 300 мкл. Целевая доза составляла 6 мкг/кг эквивалента трепростинила.

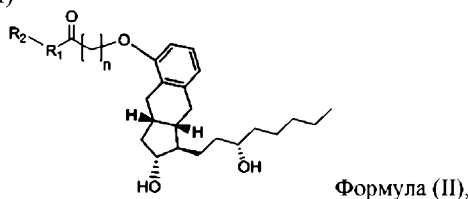
Уровни трепростинила в плазме крови были значительно ниже, чем при использовании композиции в форме наночастиц T568 (40 мол.% C₁₂-TR, 40 мол.% сквалана, 10 мол.% chol-PEG2k, 10 мол.% DOPC), содержащей алкиловый сложный эфир C₁₂-TR в той же дозе. Это свидетельствует о том, что скорость превращения амидного пролекарства намного медленнее, чем скорость сложноэфирного пролекарства трепростинила.

Хотя данное изобретение описано со ссылкой на его конкретные воплощения, специалистам в данной области должно быть понятно, что могут быть произведены различные изменения и могут быть использованы эквиваленты, не выходящие за рамки истинного замысла и объема изобретения. Кроме того, может быть сделано много модификаций для адаптирования конкретной ситуации, вещества, композиции вещества, способа, стадии или стадий способа к объективной сущности и объему описанного изобретения. Все такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Патенты, патентные заявки, публикации патентных заявок, журнальные статьи и протоколы, упомянутые в данном описании, включены во всей их полноте для всех целей посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (II)



где R_1 представляет собой O;

R_2 представляет собой тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил или октадецил;
 n означает 1.

2. Соединение по п.1, где R_2 представляет собой тетрадецил.
3. Соединение по п.1, где R_2 представляет собой пентадецил.
4. Соединение по п.1, где R_2 представляет собой гексадецил.
5. Соединение по п.1, где R_2 представляет собой гептадецил.
6. Соединение по п.1, где R_2 представляет собой октадецил.
7. Соединение по п.1, где R_2 является линейным.
8. Соединение по п.1, где R_2 является разветвленным.
9. Фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (PH) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение по любому из пп.1-7 и амфифильный агент.
10. Фармацевтическая композиция по п.9, где амфифильный агент представляет собой пэгилированный липид, поверхностно-активное вещество, жирную кислоту или блок-сополимер.
11. Фармацевтическая композиция по п.10, где амфифильный агент представляет собой поверхностно-активное вещество.
12. Фармацевтическая композиция по п.11, где поверхностно-активное вещество является неионным.
13. Фармацевтическая композиция по п.9, где амфифильный агент представляет собой жирную кислоту.
14. Фармацевтическая композиция по п.10, где блок-сополимер представляет собой PEO-PPO-PEO (полиэтиленоксид-полипропиленоксид-полиэтиленоксид) или PEO-поли(изопрен)-PEO.
15. Фармацевтическая композиция по п.10, где амфифильный агент представляет собой пэгилированный липид.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где пэгилированный липид содержит PEG400, PEG500, PEG1000, PEG2000, PEG3000, PEG4000 или PEG5000.
17. Фармацевтическая композиция по п.16, где пэгилированный липид содержит PEG1000.
18. Фармацевтическая композиция по п.16, где пэгилированный липид содержит PEG2000.
19. Фармацевтическая композиция по любому из пп.16-18, где липид представляет собой холестерин.
20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.16-18, где липид представляет собой фосфолипид.
21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.16-18, где липид представляет собой дистеарилфосфатидилэтаноламин (DSPE).
22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.16-18, где липид представляет собой димиристоилфосфэтаноламин (DMPE).
23. Фармацевтическая композиция по любому из пп.16-18, где липид представляет собой дистеарилглицерин (DSG).
24. Фармацевтическая композиция по п.15, где пэгилированный липид представляет собой холестерин-PEG2000, DSPE-PEG1000, DSPE-PEG2000 или DSG-PEG2000.
25. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-24, дополнительно содержащая гидрофобную добавку.
26. Фармацевтическая композиция по п.25, где гидрофобная добавка представляет собой углеводород, терпен или гидрофобный липид, алкиловый сложный эфир, холестерилловый сложный эфир, моно-, ди-, триалкилглицерид.
27. Фармацевтическая композиция по п.25 или 26, где гидрофобная добавка представляет собой углеводород.
28. Фармацевтическая композиция по п.25 или 26, где гидрофобная добавка представляет собой терпен.
29. Фармацевтическая композиция по п.25 или 26, где гидрофобная добавка представляет собой гидрофобный липид.
30. Фармацевтическая композиция по п.28, где терпен представляет собой сквалан.
31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-30, содержащая суспензию наночастиц в вод-

ной среде.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-30, приготовленная в виде сухого порошка.
33. Сухая порошковая фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (РН) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение по любому из пп.1-7.
34. Фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (РН) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение по любому из пп.1-7 и пропеллент.
35. Способ лечения легочной гипертензии (РН) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-7 или фармацевтической композиции по любому из пп.9-34.
36. Способ по п.35, где пациентом является пациент, имеющий РН группы I согласно классификации WHO (Всемирная организация здравоохранения).
37. Способ по п.35, где пациентом является пациент, имеющий РН группы II согласно классификации WHO.
38. Способ по п.35, где пациентом является пациент, имеющий РН группы III согласно классификации WHO.
39. Способ по п.35, где пациентом является пациент, имеющий РН группы IV согласно классификации WHO.
40. Способ по п.35, где пациентом является пациент, имеющий РН группы V согласно классификации WHO.
41. Способ по п.35, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента.
42. Способ по любому из пп.35-40, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят пациенту перорально, назально, внутривенно или подкожно.
43. Способ по любому из пп.35-41, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием дозирующего ингалятора.
44. Способ по п.41, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием сухого порошкового ингалятора.
45. Способ по любому из пп.35-41, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием небулайзера.
46. Способ по любому из пп.35-41 и 43-45, где введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции приводит к снижению количества побочных эффектов у пациента или к снижению тяжести побочного эффекта у пациента по сравнению с количеством побочных эффектов или тяжестью побочного эффекта у пациента при введении трепростинила или илопроста.
47. Способ по п.42, где введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции приводит к снижению количества побочных эффектов у пациента или к снижению тяжести побочного эффекта у пациента по сравнению с количеством побочных эффектов или тяжестью побочного эффекта у пациента при введении трепростинила или илопроста.
48. Способ по п.46, где снижение тяжести побочного эффекта представляет собой снижение частоты или тяжести кашлевой реакции.
49. Способ по любому из пп.35-48, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят один раз в сутки.
50. Способ по любому из пп.35-48, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят два раза в сутки.
51. Способ по любому из пп.35-48, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят три или более раз в сутки.
52. Способ по п.45, где небулайзер представляет собой вибрационный меш-небулайзер.
53. Способ лечения легочной артериальной гипертензии (РАН) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-7.
54. Способ лечения легочной артериальной гипертензии (РАН) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп.9-34.
55. Способ по п.53 или 54, где пациентом является пациент, имеющий РАН класса I согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA).
56. Способ по п.53 или 54, где пациентом является пациент, имеющий РАН класса II согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA).
57. Способ по п.53 или 54, где пациентом является пациент, имеющий РАН класса III согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA).
58. Способ по п.53 или 54, где пациентом является пациент, имеющий РАН класса IV согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA).
59. Способ по п.53 или 54, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента.
60. Способ по любому из пп.53-58, где эффективное количество соединения или фармацевтической

композиции вводят пациенту перорально, назально, внутривенно или подкожно.

61. Способ по п.59, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием дозирующего ингалятора.

62. Способ по п.59, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием сухого порошкового ингалятора.

63. Способ по любому из пп.53-59, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием небулайзера.

64. Способ по любому из пп.53-63, где введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции приводит к снижению количества побочных эффектов у пациента или к снижению тяжести побочного эффекта у пациента по сравнению с количеством побочных эффектов или тяжестью побочного эффекта у пациента при введении трепростинила или илопроста.

65. Способ по п.64, где снижение тяжести побочного эффекта представляет собой снижение тяжести кашлевой реакции.

66. Способ по любому из пп.53-65, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят один раз в сутки.

67. Способ по любому из пп.53-65, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят два раза в сутки.

68. Способ по любому из пп.53-65, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят три или более раз в сутки.

69. Способ по п.63, где небулайзер представляет собой вибрационный меш-небулайзер.

70. Способ лечения хронической тромбоэмболической легочной гипертензии у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-7 или фармацевтической композиции по любому из пп.9-34.

71. Способ лечения портолегочной гипертензии (PPH) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-7.

72. Способ лечения портолегочной гипертензии (PPH) у нуждающегося в этом пациента, включающий введение этому пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп.9-34.

73. Способ по любому из пп.70-72, где эффективное количество соединения или композиции вводят в легкие пациента.

74. Способ по любому из пп.70-72, где эффективное количество соединения или композиции вводят пациенту перорально, назально, внутривенно или подкожно.

75. Способ по любому из пп.70-72, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием дозирующего ингалятора.

76. Способ по любому из пп.70-72, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием сухого порошкового ингалятора.

77. Способ по любому из пп.70-72, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят в легкие пациента с использованием небулайзера.

78. Способ по любому из пп.70-77, где введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции приводит к снижению количества побочных эффектов у пациента или к снижению тяжести побочного эффекта у пациента по сравнению с количеством побочных эффектов или тяжестью побочного эффекта у пациента при введении трепростинила или илопроста.

79. Способ по п.78, где снижение тяжести побочного эффекта представляет собой снижение тяжести кашлевой реакции.

80. Способ по любому из пп.70-79, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят один раз в сутки.

81. Способ по любому из пп.70-79, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят два раза в сутки.

82. Способ по любому из пп.70-79, где эффективное количество соединения или фармацевтической композиции вводят три раза в сутки.

83. Способ по п.77, где небулайзер представляет собой вибрационный меш-небулайзер.

84. Способ по любому из пп.35-83, где введение соединения или фармацевтической композиции нуждающемуся в этом пациенту обеспечивает большую среднюю площадь под кривой (AUC_{0-t}) для соединения и/или трепростинила в легких или плазме крови по сравнению со средней AUC_{0-t} для трепростинила в легких или плазме крови, когда пациенту вводят трепростинил.

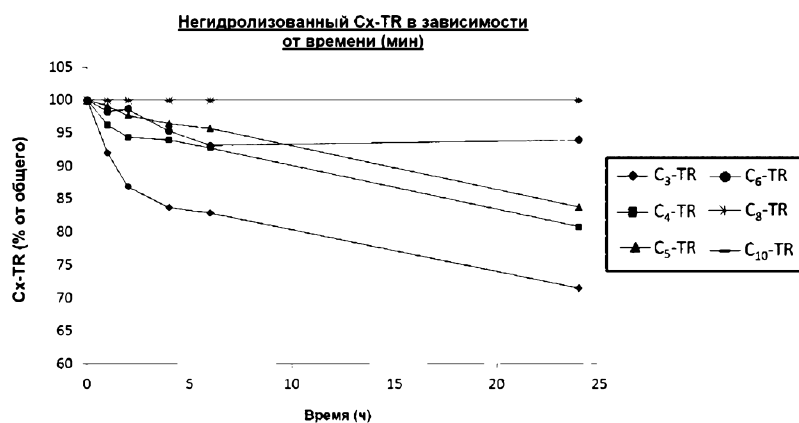
85. Способ по любому из пп.35-83, где введение соединения или фармацевтической композиции нуждающемуся в этом пациенту обеспечивает более длительное время до достижения максимальной концентрации (t_{max}) в легких или плазме крови для соединения по сравнению с t_{max} в легких или плазме крови для трепростинила, когда пациенту вводят трепростинил.

86. Способ по любому из пп.35-83, где введение соединения или фармацевтической композиции нуждающемуся в этом пациенту обеспечивает больший легочный период полувыведения ($t_{1/2}$) соединения по сравнению с легочным $t_{1/2}$ трепростинила.

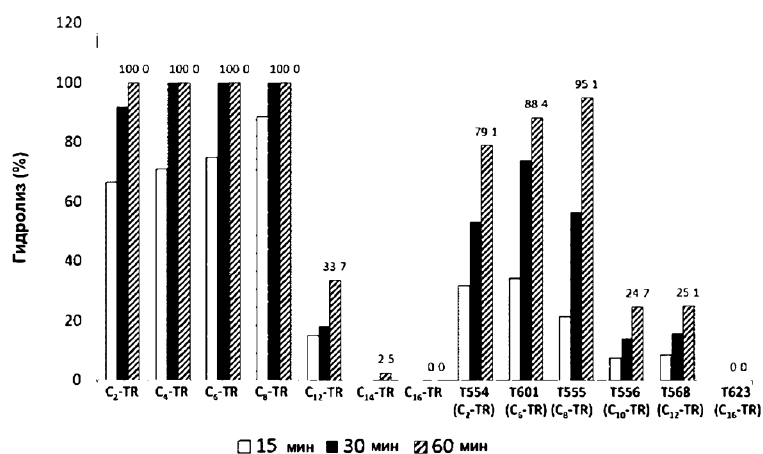
87. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-34 в аэрозольной форме.

88. Фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (PH) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение по п.1, DSPE-PEG2000 и сквалан.

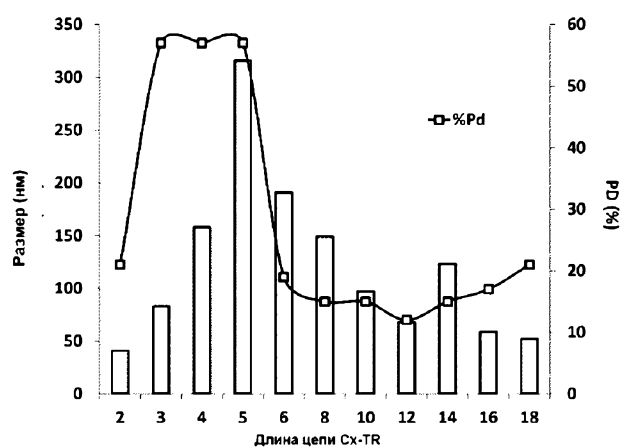
89. Фармацевтическая композиция для лечения легочной гипертензии (PH) и портолегочной гипертензии (PPH), содержащая соединение по п.1 и DSPE-PEG2000.



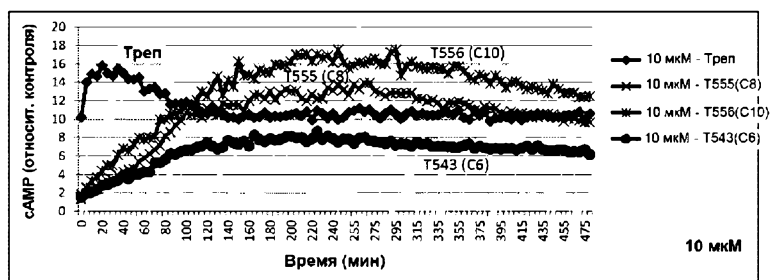
Фиг. 1А



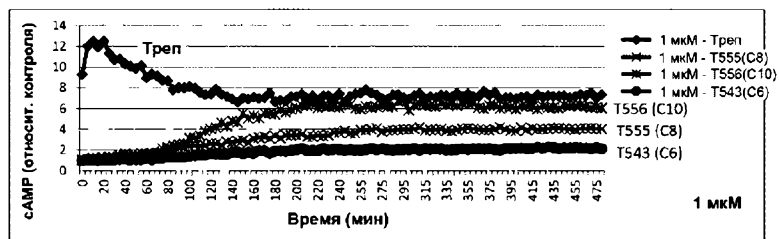
Фиг. 1В



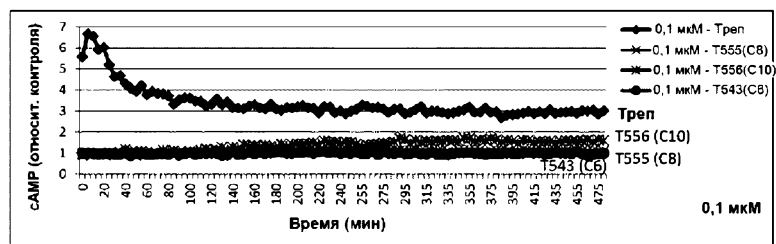
Фиг. 2



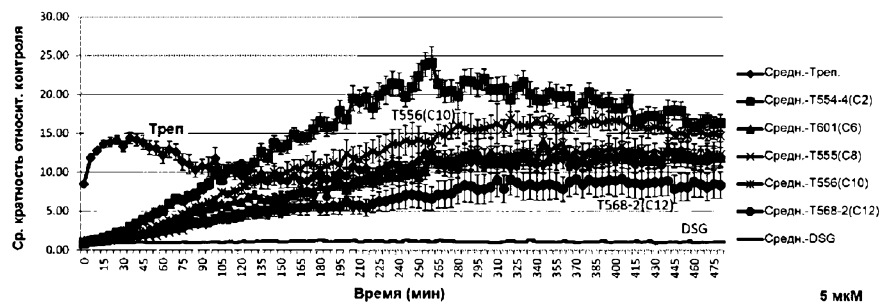
Фиг. 3А



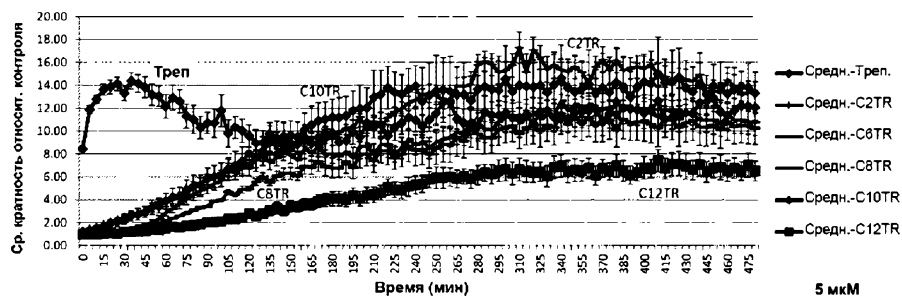
Фиг. 3В



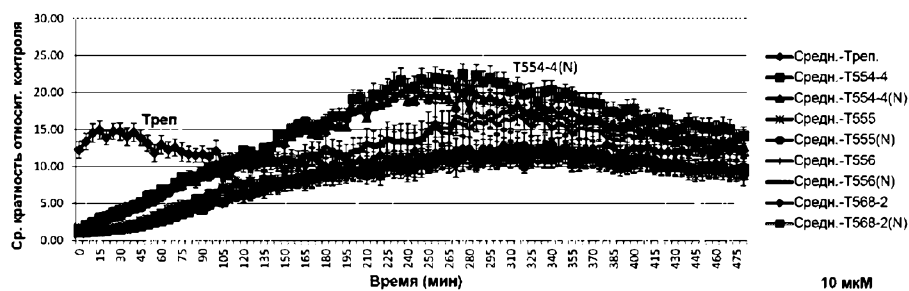
Фиг. 3С



Фиг. 4



Фиг. 5

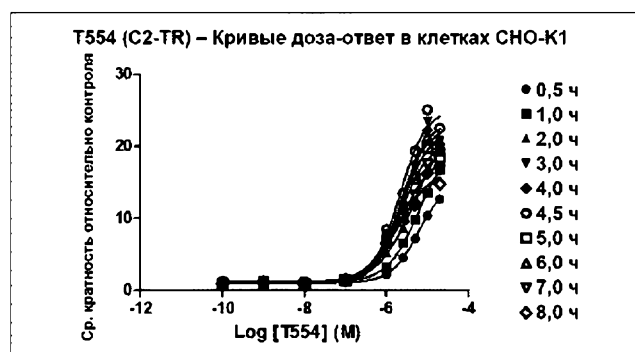


Фиг. 6



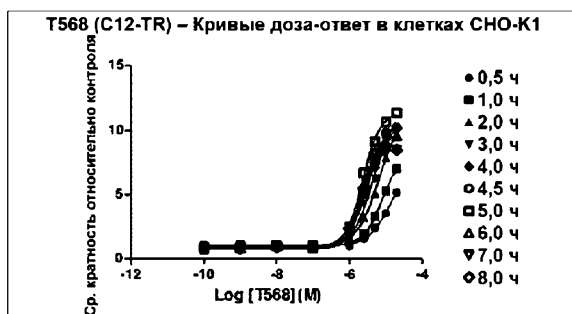
	Трен-0,5 ч	Трен-1,0 ч	Трен-2,0 ч	Трен-3,0 ч	Трен-4,0 ч	Трен-4,5 ч	Трен-5,0 ч	Трен-6,0 ч	Трен-7,0 ч	Трен-8,0 ч
EC50 (M)	1.84e-7	2.18e-7	1.53e-7	1.6e-7	1.9e-7	2.01e-7	2.59e-7	2.92e-7	4.62e-7	4.43e-7

Фиг. 7



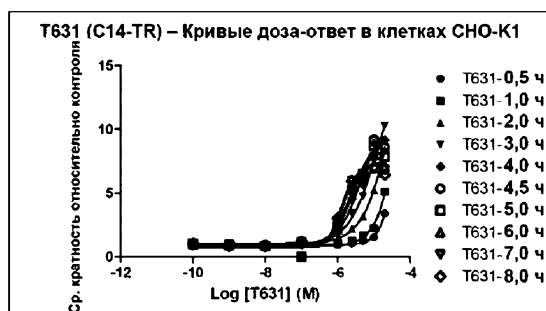
	T554 (C ₂ -TR)-0,5 ч	T554 (C ₂ -TR)-1,0 ч	T554 (C ₂ -TR)-2,0 ч	T554 (C ₂ -TR)-3,0 ч	T554 (C ₂ -TR)-4,0 ч	T554 (C ₂ -TR)-4,5 ч	T554 (C ₂ -TR)-5,0 ч	T554 (C ₂ -TR)-6,0 ч	T554 (C ₂ -TR)-7,0 ч	T554 (C ₂ -TR)-8,0 ч
EC50 (M)	5 96e-6	6 05e-6	5 25e-6	2 43e-6	2 14e-6	2 12e-6	2 22e-6	2 31e-6	2 28e-6	1 96e-6

Фиг. 8



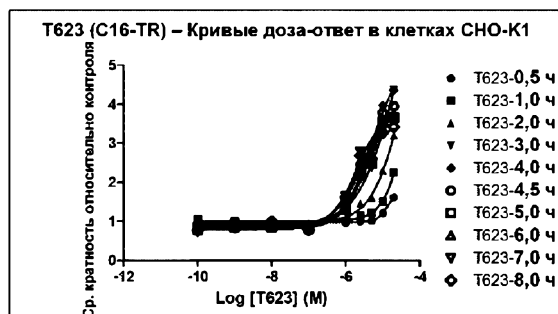
	T568 (C12-TR)- 0,5 ч	T568 (C12-TR)- 1,0 ч	T568 (C12-TR)- 2,0 ч	T568 (C12-TR)- 3,0 ч	T568 (C12-TR)- 4,0 ч	T568 (C12-TR)- 4,5 ч	T568 (C12-TR)- 5,0 ч	T568 (C12-TR)- 6,0 ч	T568 (C12-TR)- 7,0 ч	T568 (C12-TR)- 8,0 ч
EC50 (M)	1.22e-5	8.07e-6	6.54e-6	4.12e-6	3.21e-6	3.06e-6	2.37e-6	2.33e-6	2.24e-6	2.03e-6

Фиг. 9



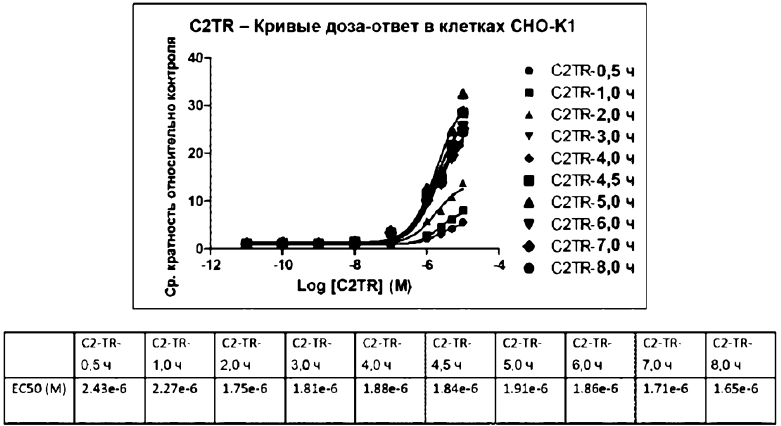
	T631 (C14-TR)- 0,5 ч	T631 (C14-TR)- 1,0 ч	T631 (C14-TR)- 2,0 ч	T631 (C14-TR)- 3,0 ч	T631 (C14-TR)- 4,0 ч	T631 (C14-TR)- 4,5 ч	T631 (C14-TR)- 5,0 ч	T631 (C14-TR)- 6,0 ч	T631 (C14-TR)- 7,0 ч	T631 (C14-TR)- 8,0 ч
EC50 (M)	~0.0015	~0.0088	3.40e-5	1.24e-6	3.97e-6	2.79e-6	2.17e-6	1.88e-6	1.45e-6	1.24e-6

Фиг. 10

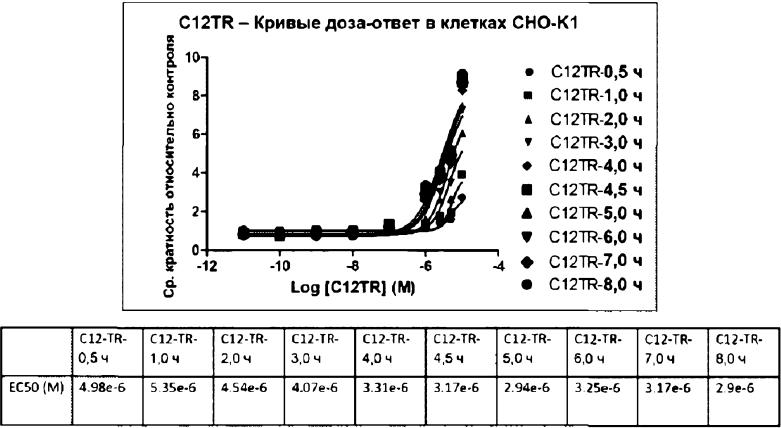


	T623 (C16-TR)- 0,5 ч	T623 (C16-TR)- 1,0 ч	T623 (C16-TR)- 2,0 ч	T623 (C16-TR)- 3,0 ч	T623 (C16-TR)- 4,0 ч	T623 (C16-TR)- 4,5 ч	T623 (C16-TR)- 5,0 ч	T623 (C16-TR)- 6,0 ч	T623 (C16-TR)- 7,0 ч	T623 (C16-TR)- 8,0 ч
EC50 (M)	1.37e-5	~0.0090	4.29e-5	2.48e-5	5.12e-6	4.59e-6	3.87e-6	2.78e-6	1.97e-6	1.77e-6

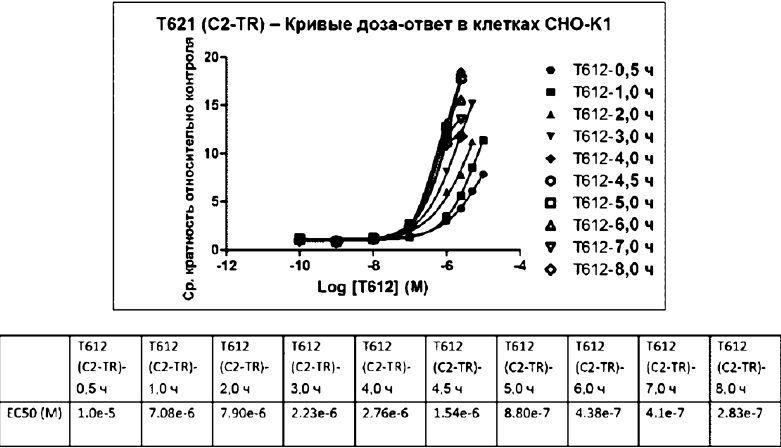
Фиг. 11



Фиг. 12



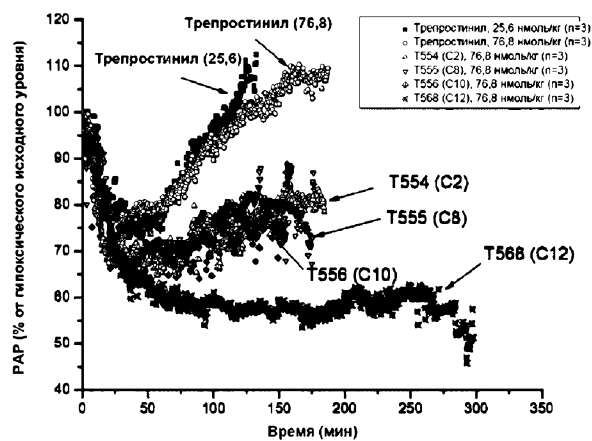
Фиг. 13



Фиг. 14



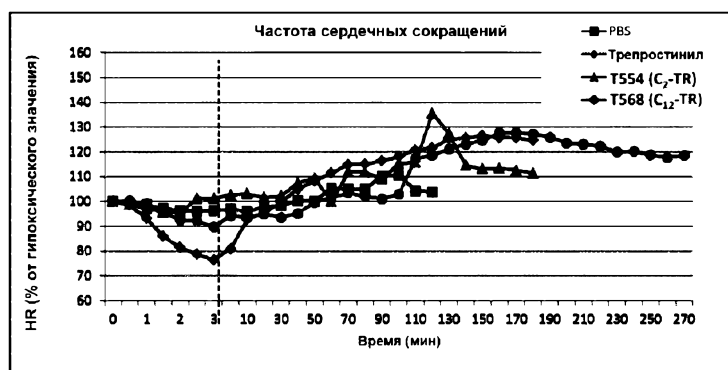
Фиг. 15А



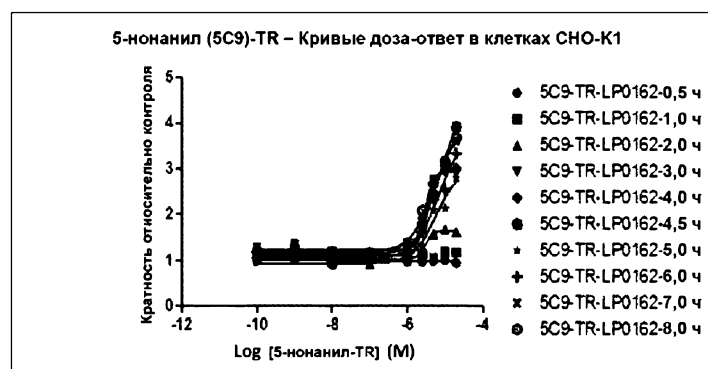
Фиг. 15В



Фиг. 16



Фиг. 17



	5C9-TR-0,5 ч	5C9-TR-1,0 ч	5C9-TR-2,0 ч	5C9-TR-3,0 ч	5C9-TR-4,0 ч	5C9-TR-4,5 ч	5C9-TR-5,0 ч	5C9-TR-6,0 ч	5C9-TR-7,0 ч	5C9-TR-8,0 ч
EC50 (M)	~7.56E-9	Not Conv	3.00E-06	2.98E-06	3.15E-06	7.23E-06	5.57E-06	6.99E-06	5.08E-06	5.99E-06

Фиг. 18



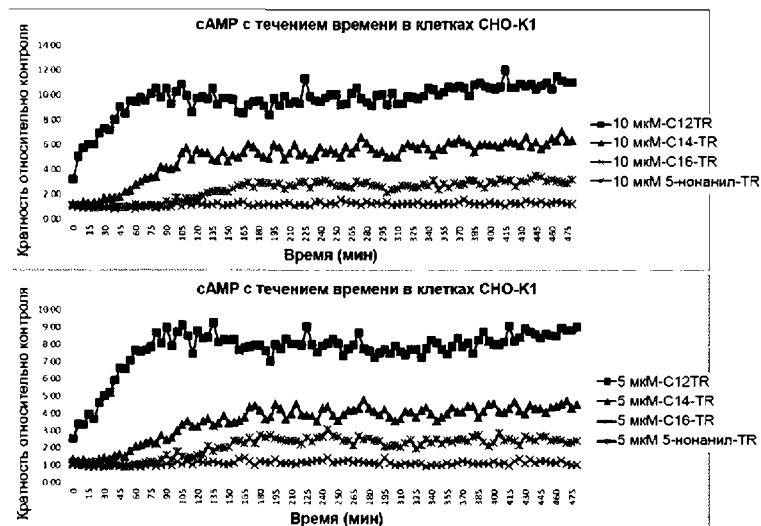
	C14TR- 0,5 ч	C14TR- 1,0 ч	C14TR- 2,0 ч	C14TR- 3,0 ч	C14TR- 4,0 ч	C14TR- 4,5 ч	C14TR- 5,0 ч	C14TR- 6,0 ч	C14TR- 7,0 ч	C14TR- 8,0 ч
EC50 (M)	4.38E-06	5.00E-06	4.74E-06	3.70E-06	3.48E-06	3.51E-06	3.43E-06	3.43E-06	3.59E-06	3.89E-06

Фиг. 19

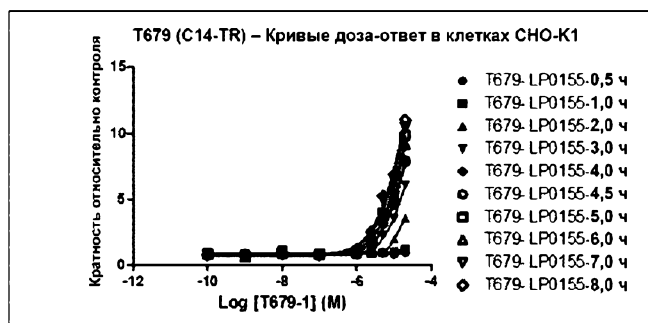


	C16TR- 0,5 ч	C16TR- 1,0 ч	C16TR- 2,0 ч	C16TR- 3,0 ч	C16TR- 4,0 ч	C16TR- 4,5 ч	C16TR- 5,0 ч	C16TR- 6,0 ч	C16TR- 7,0 ч	C16TR- 8,0 ч
EC50 (M)	~1.1e-10	~3.5e-11	~0.0565	~0.0284	4.92E-05	~0.00043	~6.84e-5	~0.0565	~0.0284	4.92E-05

Фиг. 20

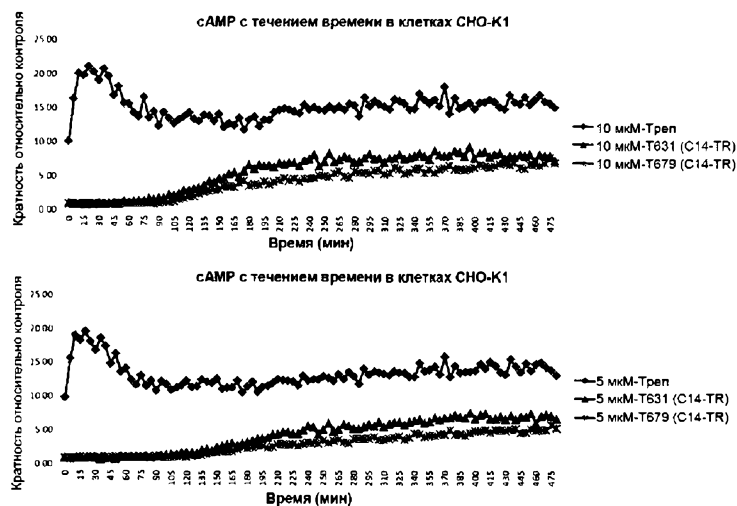


Фиг. 21

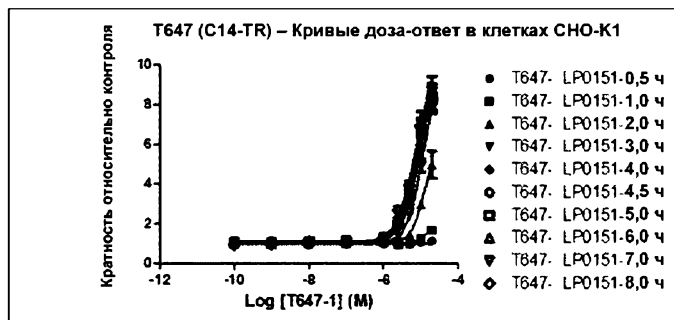


	T679- 0,5 ч	T679- 1,0 ч	T679- 2,0 ч	T679- 3,0 ч	T679- 4,0 ч	T679- 4,5 ч	T679- 5,0 ч	T679- 6,0 ч	T679- 7,0 ч	T679- 8,0 ч
EC50 (M)	~ 4.05e-5	1.41E-05	1.37E-05	1.96E-05	2.23E-05	1.63E-05	2.22E-05	2.17E-05	1.71E-05	1.80E-05

Фиг. 22

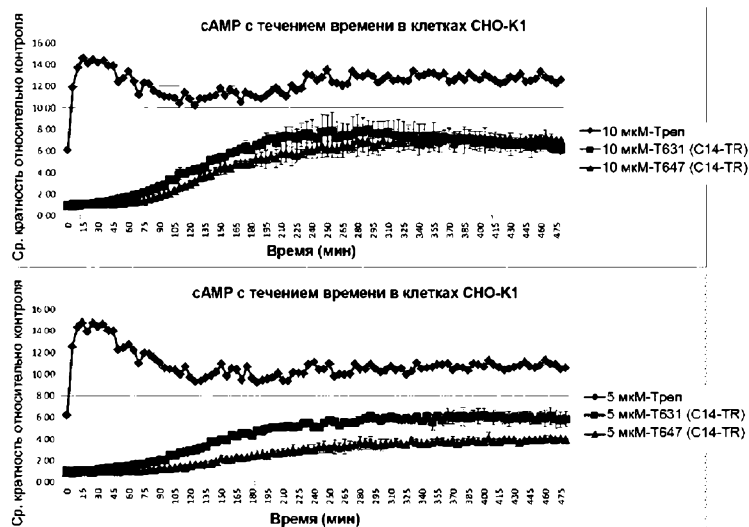


Фиг. 23

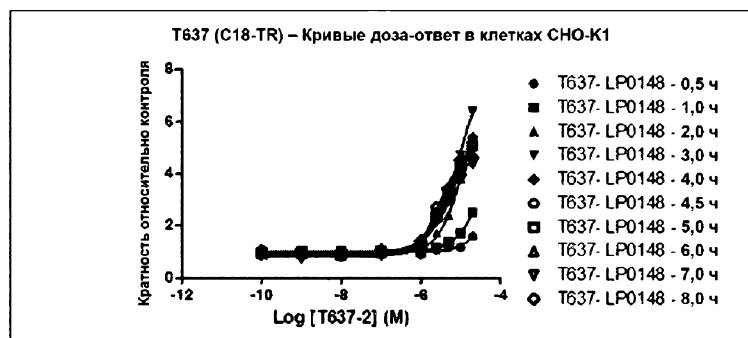


	T647- 0,5 ч	T647- 1,0 ч	T647- 2,0 ч	T647- 3,0 ч	T647- 4,0 ч	T647- 4,5 ч	T647- 5,0 ч	T647- 6,0 ч	T647- 7,0 ч	T647- 8,0 ч
EC50 (M)	~ 3.29e-07	1.16E-05	1.23E-05	1.13E-05	9.44E-06	7.99E-06	7.44E-06	7.19E-06	7.28E-06	6.66E-06

Фиг. 24

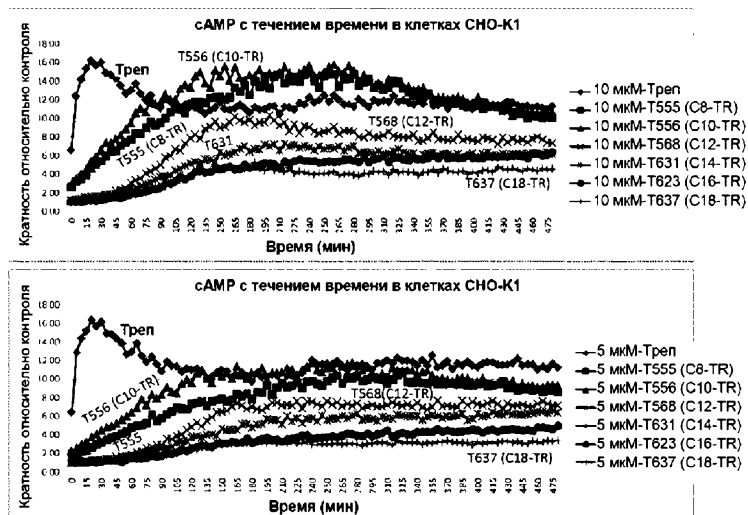


Фиг. 25

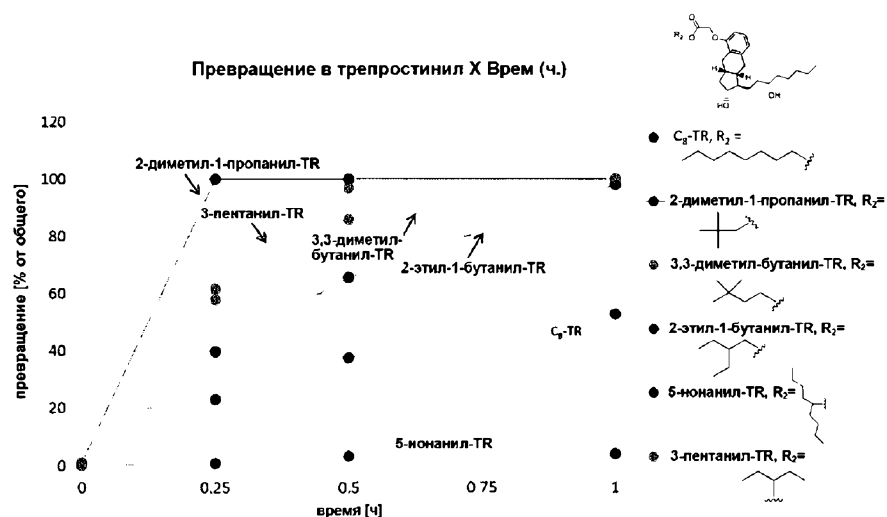


	T637- 0,5 ч	T637- 1,0 ч	T637- 2,0 ч	T637- 3,0 ч	T637- 4,0 ч	T637- 4,5 ч	T637- 5,0 ч	T637- 6,0 ч	T637- 7,0 ч	T637- 8,0 ч
EC50 (M)	~ 0.01208	~ 0.00016	1.16E-05	9.67E-06	1.09E-05	6.81E-06	5.27E-06	3.91E-06	3.46E-06	2.59E-06

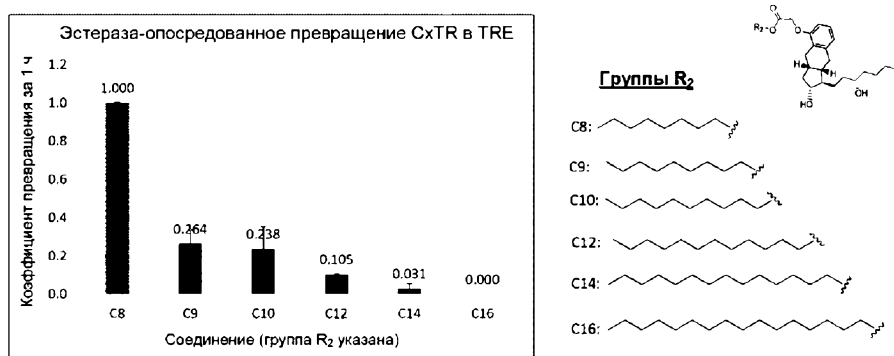
Фиг. 26



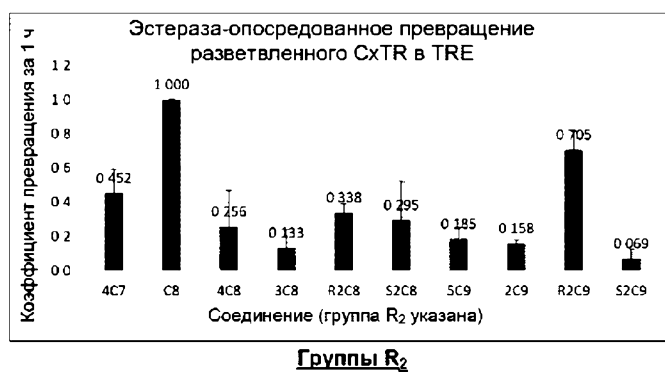
Фиг. 27



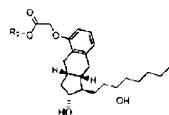
Фиг. 28

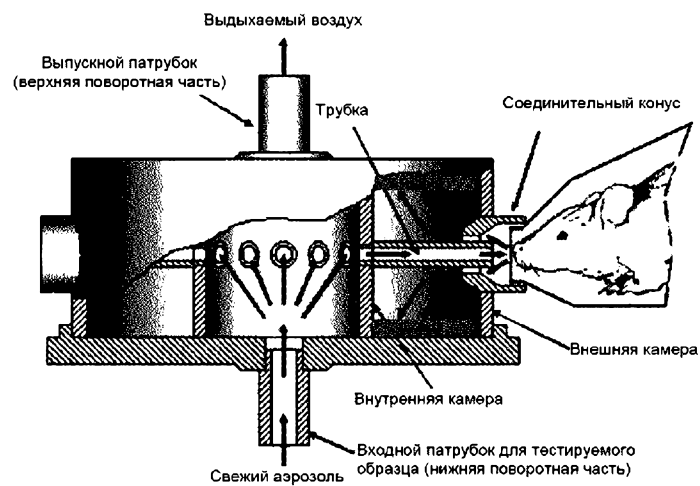


Фиг. 29

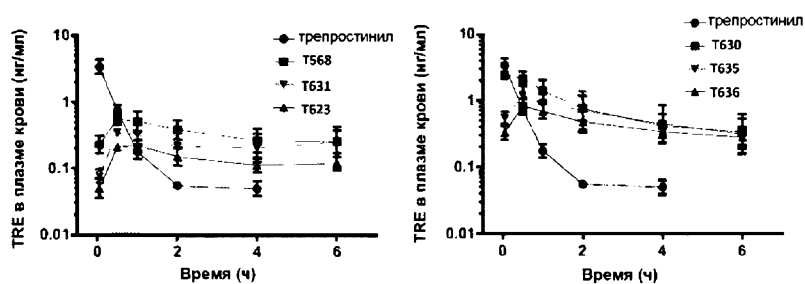


Фиг. 30

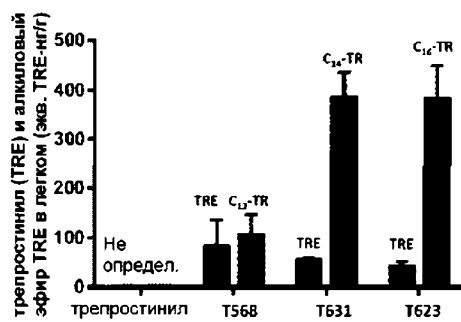




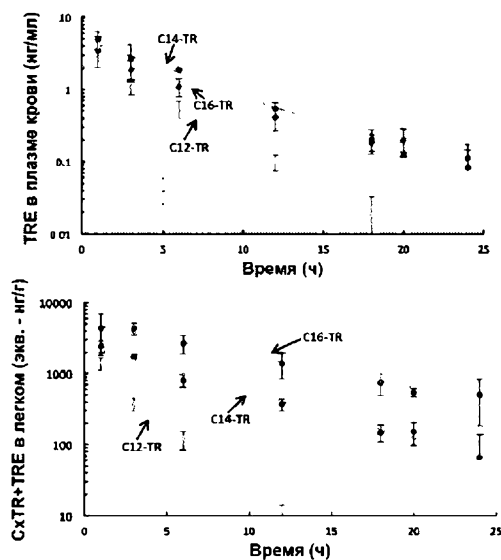
Фиг. 31



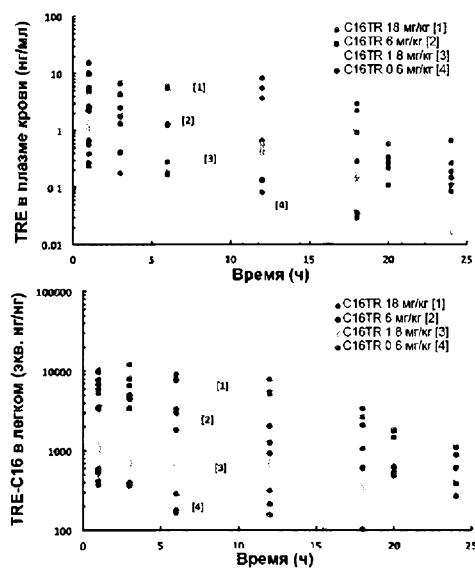
Фиг. 32



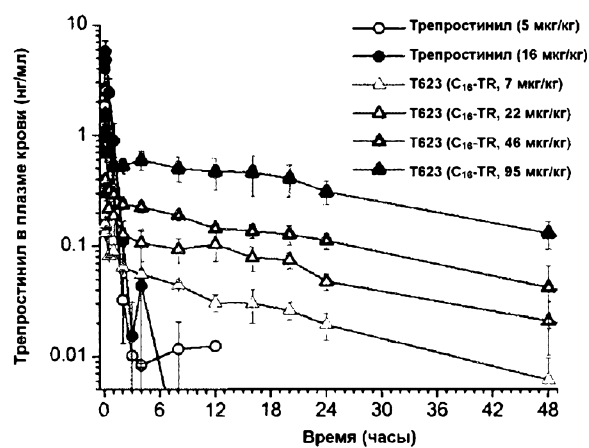
Фиг. 33



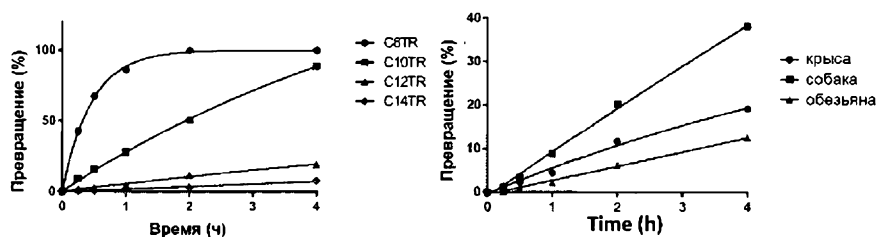
Фиг. 34



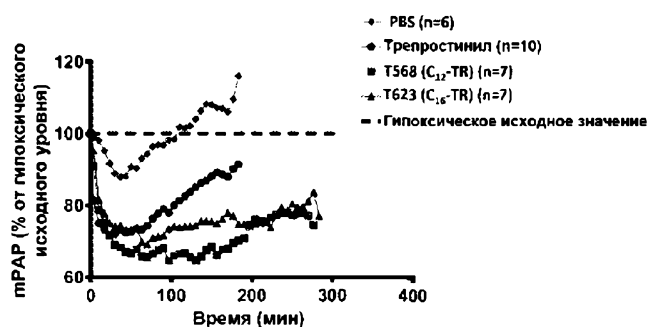
Фиг. 35



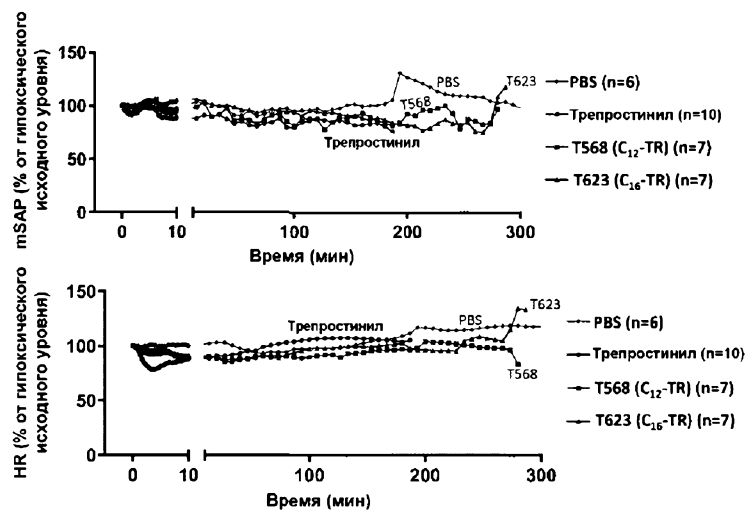
Фиг. 36



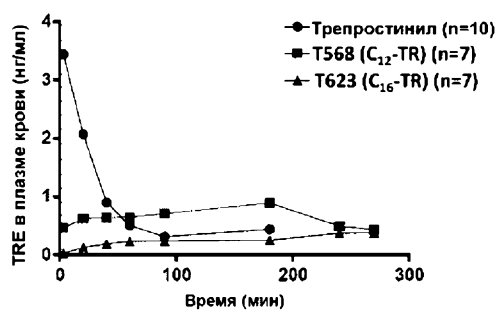
Фиг. 37



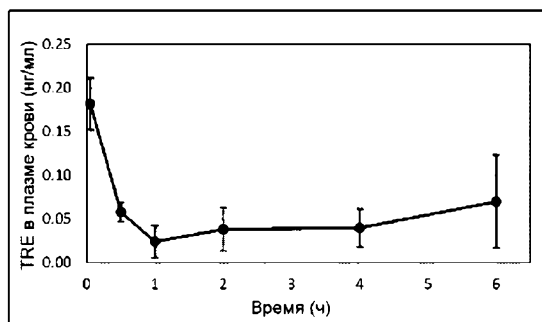
Фиг. 38



Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41

