

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **016052**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2012.01.30

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)

(21) Номер заявки
200701180

(22) Дата подачи заявки
2005.11.23

(54) N- α -(БЕНЗИЛОКСИКАРБОНИЛ)-L- γ -ГЛУТАМИЛ-3-[[2-[[БИС(БИС(2-ХЛОРЕТИЛ)АМИНО]ФОСФОНИЛ]ОКСИ]ЭТИЛ]СУЛЬФОНИЛ]-L-АЛАНИЛ-2(R)-ФЕНИЛГЛИЦИН ИЛИ ЕГО СОЛЬ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭТО СОЕДИНЕНИЕ, ПРИМЕНЕНИЕ ЭТОГО СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ЭТОГО СОЕДИНЕНИЯ

(31) 11/018,391

(32) 2004.12.21

(33) US

(43) 2008.04.28

(86) PCT/US2005/042693

(87) WO 2006/068769 2006.06.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТЕЛИК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Боуланджер Уилльям А. (US), Колиер
Стивен Дж. (SG), Истам Стивен А.,
Иди Деннис Л. (US), Гевель Ронан
И. (FR), Эрнандес-Абад Педро Э.,
Херр Джейсон Р. (US), Кьэрсгорд Ханс
Й. (DK), Меклер Харолд, Поломски
Роберт Э., Шоу Стивен Р., Жичкин
Павел Э. (US)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Пивницкая Н.Н.,
Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б.,
Каксис Р.А., Комарова О.М., Белоусов
Ю.В. (RU)

(56) CIACCIO P.J. ET AL.: "MODULATION OF DETOXIFICATION GENE EXPRESSION IN HUMAN COLON HT29 CELLS BY GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE INHIBITORS" MOLECULAR PHARMACOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 48, no. 4, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 639-647, XP000601686 ISSN: 0026-895X figure 1

LYTTLE M.H. ET AL.: "GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ACTIVATES NOVEL ALKYLATING AGENTS" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 37, no. 10, 1994, pages 1501-1507, XP000652018 ISSN: 0022-2623 cited in the application figure 8 figure 8 page 1503, column 2, lines 1-9 from the bottom page 1506, column 2; figure 8; compounds 16, 17

MCINTYRE J.A. ET AL.: "Canfosfamide hydrochloride - Oncolytic - DNA alkylating drug" DRUGS OF THE FUTURE, BARCELONA, ES, vol. 29, no. 10, October 2004 (2004-10), pages 985-991, XP002345162 ISSN: 0377-8282 page 987, column 2 - page 989, column 1 page 1, column 2 scheme 1

(57) В изобретении описано соединение N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-3-[[2-[[бис(бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицин или его соль, фармацевтическая композиция, содержащая это соединение, применение этого соединения для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака, а также способ лечения рака у млекопитающего, включающий введение млекопитающему этого соединения.

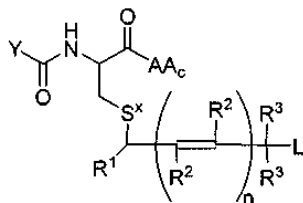
B1**016052****016052 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицину и его солям и, в частности, к фармацевтической композиции, включающей это соединение, применению этого соединения для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака, и к способу лечения рака у млекопитающего, включающий введение млекопитающему этого соединения.

Уровень техники

В патенте US № 5556942 и в международной публикации PCT № WO 95/09866 раскрыты соединения формулы



и их амиды, сложные эфиры и соли, где

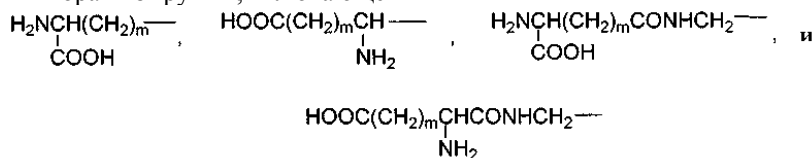
L обозначает отщепляющуюся электроакцепторную группу;

S^X обозначает $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-S(=NH)-$, $-S(=O)(=NH)-$, $-8^+(C_1-C_6\text{алкил})-$, $-Se(=O)-$, $-Se(=O)_2-$, $-Se(=NH)-$ или $-Se(=O)(=NH)-$ или обозначает $-O-C(=O)-$ или $-HN-C(=O)-$;

каждый R^1 , R^2 и R^3 независимо обозначает H или не оказывающий мешающего действия заместитель;

n равно 0, 1 или 2;

Y выбран из группы, включающей



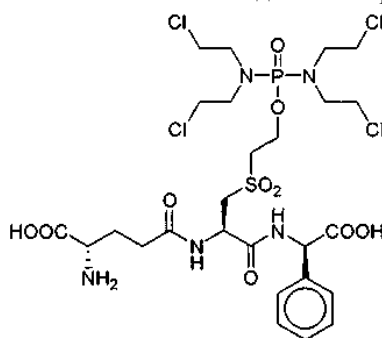
где m равно 1 или 2; и

AAc обозначает аминокислоту, связанную с остальной частью соединения с помощью пептидной связи,

и их синтез.

Утверждается, что эти соединения применимы в качестве лекарственных средств для селективного лечения тканей-мишеней, которые содержат совместимые GST изоферменты, и одновременно повышают содержание клеток-предшественников GM в костном мозге. Раскрытые варианты значений L включают такие, которые приводят к образованию лекарственных средств, являющихся цитотоксичными по отношению к нежелательным клеткам, включая фосфородиамидат- и фосфородиамидатиприпы.

TLK286, обозначенный в этих публикациях, как TER 286 и обладающий названием γ -глутамил- α -амино- β -(2-этил-N,N,N,N-тетра(2'-хлор)этилфосфорамидат)сульфонил)пропионил-(R)-(-)-фенилглицин, является одним из этих соединений. TLK286 является соединением формулы



Для самого TLK286 предложено международное непатентованное название (pINN) канфосфамид и принятое в США название (USAN) гидрохлорида TLK286 представляет собой канфосфамидгидрохлорид.

В публикации Lyttle et al., J. Med. Chem., 37:1501-1507 (1994) раскрыты канфосфамид и два его аналога, их синтез и их взаимодействие с тремя изоферментами GST. Синтез включает реакцию незащищенного трипептида [L- γ -глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина в случае канфосфамида] с 2-бромэтилфосфородиамидатом [2-бромэтил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидатом в случае канфосфамида] с последующим окислением полученного простого тиоэфира пероксидом водорода и надуксусной кислотой.

Канфосфамид является противораковым соединением, которое активируется путем воздействия

GST P1-1 и GST A1-1 для высвобождения цитотоксичного фосфородиамидатного фрагмента. После активации канфосфамида посредством GST P1-1 апоптоз индуцируется с помощью отвечающего на стресс сигнального пути с активацией киназ MKK4, JNK, p38 MAP и каспазы 3. In vitro показано, что канфосфамид является более активным по отношению к клеткам линии M6709 карциномы ободочной кишки человека, выбранной вследствие резистентности по отношению к доксорубину, и клеткам линии MCF-7 карциномы молочной железы человека, выбранной вследствие резистентности по отношению к циклофосфамиду, которые сверхэкспрессируют GST P1-1, чем по отношению к их родительским линиям клеток; и для мышинных ксеротрансплантатов M7609, в которых с помощью генной инженерии образованы большие, средние и низкие уровни GST P1-1, активность канфосфамидгидрохлорида положительно коррелирует с уровнем GST P1-1 (Morgan et al., Cancer Res., 58:2568 (1998)).

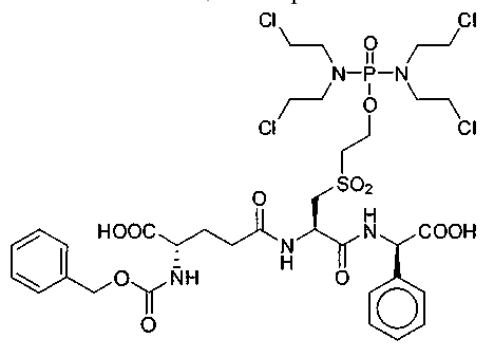
В настоящее время в множестве клинических исследований изучается применимость канфосфамидгидрохлорида в качестве единственного препарата для лечения рака яичника, молочной железы, немелкоклеточного рака легких и колоректального рака. Обнаружено, что при его использовании в качестве единственного препарата проявляется значительная противоопухолевая активность и улучшается выживаемость пациентов, страдающих немелкоклеточным раком легких и раком яичника, и при его использовании в качестве единственного препарата проявляется противоопухолевая активность при колоректальном раке и раке молочной железы. Данные, полученные in vitro для культур клеток и с помощью биопсии опухолей, показали, что применение канфосфамида не приводит к перекрестной резистентности по отношению к соединениям платины, паклитакселу и доксорубину (Rosario et al., Моль. Pharmacol., 58:167 (2000)), а также гемцитабину. У пациентов, которых лечили канфосфамидгидрохлоридом, наблюдается очень низкая частота клинически значимой гематологической токсичности.

Негг et al., Org. Proc. Res. Dev., 5:442-444 (2001), описали ретросинтетическую методику получения канфосфамида из незащищенного пептида L-γ-глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина и 2-(арилсульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидата и синтез 2-(арилсульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидата в три стадии, исходя из POCl₃ через 2-гидроксиэтил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидат. В патенте US № 6506739 и международной публикации PCT № WO 01/83496 раскрыты 2-(замещенные)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-галогенэтил)фосфородиамидаты, включая 2-гидроксиэтил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидат и 2-(арилсульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидаты, такие как 2-(4-бромбензолсульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидат.

Желательно получить новые соединения для лечения рака.

Описание изобретения

В первом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы



или его соли.

Во втором варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей указанное выше соединение или его соль.

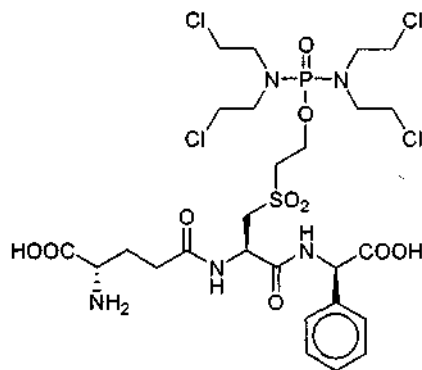
В третьем варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению указанного выше соединения или его соли для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака.

В четвертом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у млекопитающего, включающий введение млекопитающему указанного выше соединения или его соли.

Варианты осуществления изобретения

Определения

"Канфосфамид" представляет собой соединение формулы



Он обладает названием CAS L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицин.

Подходящими солями [неполный перечень см. в публикации Berge et al., J. Pharm. Sci., 66:1 (1971)] канфосфамида и соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, являются образованные с неорганическими основаниями (например, гидроксидом натрия, калия или кальция) и органическими основаниями (например, этаноламином, диэтаноломином, триэтаноломином, трометином, N-метилглюкамином) по реакции с карбоксильными группами и образованные с неорганическими кислотами (например, хлористо-водородной, бромисто-водородной, серной, азотной и хлорсульфоновой кислотами) или органическими кислотами (например, уксусной, пропионовой, щавелевой, яблочной, малеиновой, малоновой, фумаровой или виннокаменной кислотами и алкан- или аренсульфоновыми кислотами, такими как метансульфоновая, этансульфоновая, бензолсульфоновая, замещенные бензолсульфоновые, такие как хлорбензолсульфоновая и толуолсульфоновая, нафталинсульфоновая и замещенные нафталинсульфоновые, нафталиндисульфоновая и замещенные нафталиндисульфоновые и камфорсульфоновая кислоты) с образованием солей присоединения с кислотами по аминогруппе канфосфамида. Эти соли предпочтительно получают с фармацевтически приемлемыми кислотами и основаниями. Подходящими для канфосфамида солями являются соли присоединения с кислотами, в особенности гидрохлориды.

"Защитная группа аминогруппы" является группой, способной защитить глутамил-α-аминогруппу L-γ-глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина во время синтеза защищенного по аминогруппе канфосфамида с последующим удалением без воздействия на остальную часть молекулы канфосфамида. "Каталитически удаляемая защитная группа аминогруппы" представляет собой защитную группу аминогруппы, которую удаляют путем каталитического восстановления или изомеризации. Обычно такие группы представляют собой уретанообразующие группы, содержащие бензильный или аллильный атом углерода. Примерами каталитически удаляемых защитных групп аминогруппы, пригодных для применения в настоящем изобретении, являются (необязательно замещенный бензил)оксикарбонильные группы, которые обычно удаляются с помощью каталитического гидрогенолиза, и (необязательно замещенный аллил)оксикарбонильные группы, которые обычно удаляются с помощью каталитической изомеризации. Особенно подходящей каталитически удаляемой защитной группой аминогруппы является бензилоксикарбонил.

"(Необязательно замещенный бензил)оксикарбонил" включает бензилоксикарбонил и бензилоксикарбонил, содержащий в бензольном кольце 1 или 2, обычно 1 электроноакцепторный заместитель, такой как галоген (обычно хлор или бром), нитрогруппу, цианогруппу или трифторметил. Примеры (необязательно замещенный бензил)оксикарбониллов включают бензилоксикарбонил, галогенбензилоксикарбонилы, такие как 2- и 4-бромбензилоксикарбонил, 2-, 3- и 4-хлорбензилоксикарбонил и 2,4-дихлорбензилоксикарбонил, 2-, 3- и 4-нитробензилоксикарбонил, 4-цианобензилоксикарбонил и т.п.

"(Необязательно замещенный аллил)оксикарбонил" включает аллилоксикарбонил и аллилоксикарбонил, содержащий электроноакцепторный заместитель (такой как фенил, необязательно содержащий 1 или 2, обычно 1 электроноакцепторный заместитель, такой как галоген (обычно хлор или бром), нитрогруппу, цианогруппу, трифторметил или пиридил) в положении 3 аллильной группы или 1-изопропилаллилоксикарбонил. Примеры (необязательно замещенный аллил)оксикарбониллов включают аллилоксикарбонил, циннамоксикарбонил, 4-нитроциннамоксикарбонил, 3-(3'-пиридил)аллилоксикарбонил и 1-изопропилаллилоксикарбонил.

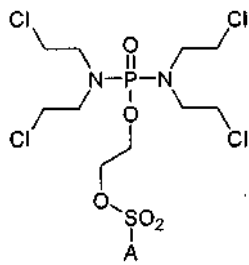
"Защитная группа атома серы" является группой, способной защитить атом серы L-γ-глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина во время синтеза соединений четвертого варианта осуществления настоящего изобретения с последующим удалением без воздействия на остальную часть молекулы соответствующего соединения третьего варианта осуществления настоящего изобретения (включая защитную группу аминогруппы). "Удаляемая путем ацидолиза защитная группа атома серы" представляет собой защитную группу атома серы, которая удаляется путем ацидолиза. Обычно такие группы представляют собой (необязательно замещенный фенил)-замещенные метильные группы. Примерами удаляемых путем ацидолиза защитных групп атома серы, пригодных для применения в настоящем изобретении, яв-

ляются трифенилметил, в котором один или большее количество бензольных колец необязательно содержат 1 или 2, обычно 1 электронодонорный заместитель, такой как метоксигруппа, например трифенилметил, (4-метоксифенил)дифенилметил или бис(4-метоксифенил)фенилметил; дифенилметил, в котором один или большее количество бензольных колец необязательно содержат 1 или 2, обычно 1 электронодонорный заместитель, такой как метоксигруппа, например дифенилметил, (4-метоксифенил)фенилметил и бис(4-метоксифенил)метил; дифенилметильные аналоги, такие как 9Н-ксантен-9-ил, 2-метокси-9Н-ксантен-9-ил, 5Н-дibenzo[a,d]циклопентен-5-ил и 10,11-динидро-5Н-дibenzo[a,d]циклопентен-5-ил; и бензил, содержащий 2 или большее количество электронодонорных заместителей, таких как метоксигруппа, например 2,4-диметоксибензил или 2,4,6-триметоксибензил. Особенно подходящей удаляемой путем ацидолиза защитной группой атома серы является трифенилметил.

Защитные группы аминогруппы включают каталитически удаляемые защитные группы аминогруппы и защитные группы атома серы, включая удаляемые путем ацидолиза защитные группы атома серы, хорошо известны в области органического синтеза и, в частности, синтеза пептидов. Такие подходящие группы и условия их удаления описаны в книгах, таких как *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Workbench edition, M. Goodman, ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 2004 и *Protective groups in organic synthesis*, 3 ed., T.W. Greene and P.G.M. Wuts, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York, New York, U.S.A., 1999, и известны специалисту с общей подготовкой в данной области техники.

Поскольку соединения четвертого варианта осуществления настоящего изобретения содержат и защитную группу аминогруппы, предпочтительно каталитически удаляемую защитную группу аминогруппы, и защитную группу атома серы, предпочтительно удаляемую путем ацидолиза защитную группу атома серы, и восьмой вариант осуществления настоящего изобретения включает удаление защитной группы атома серы из этих соединений при сохранении защитной группой аминогруппы, специалист с общей подготовкой в данной области техники должен понимать, что "защитную группу аминогруппы" и "защитную группу атома серы" не выбирают независимо и их определения следует интерпретировать в контексте их описания в заявке и последовательностях реакций, представленных на схемах реакций 1 и 2; и что защитную группу аминогруппы и защитную группу атома серы следует выбирать так, чтобы защитную группу атома серы можно было бы удалить при условиях, при которых защитная группа аминогруппы сохраняется неизменной. Такой специалист должен без труда с учетом информации, приведенной в настоящей заявке, и общей подготовки в данной области техники выбирать подходящие защитные группы аминогруппы и защитные группы атома серы и условия их удаления.

"2-(А-Сульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидаг" представляет собой соединение формулы



в которой А обозначает необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный арилалкил или необязательно замещенный гетероарилалкил. Таким образом, А включает C₁-C₄алкил, необязательно замещенный 1-3 атомами галогенов, а также необязательно замещенный нитрогруппой или цианогруппой; C₆-C₁₀арил, такой как фенил или нафтил, предпочтительно фенил, необязательно замещенный 1-3 группами, выбранными из группы, включающей галоген, нитрогруппу, цианогруппу и C₁-C₂алкил, необязательно замещенный 1-3 атомами галогенов (например, трифторметил); C₅-C₁₀гетероарил, такой как фурил, тиенил, пирролил, пиридинил, пирозинил или пиримидинил, необязательно замещенный 1-3 группами, выбранными из группы, включающей галоген, нитрогруппу, цианогруппу и C₁-C₂алкил, необязательно замещенный 1-3 атомами галогенов; и C₆-C₁₀арил-C₁-C₂алкил и C₅-C₁₀гетероарил-C₁-C₂алкил, каждый необязательно замещенный по арильной или гетероарильной группе 1-3 группами, выбранными из группы, включающей галоген, нитрогруппу, цианогруппу и C₁-C₂алкил, необязательно замещенный 1-3 атомами галогенов, и необязательно замещенный по алкильной группе 1-3 атомами галогенов. Примеры групп А включают метил, трифторметил, фенил, 4-толил, 4-нитрофенил и 4-галогенфенил, такой как 4-хлорфенил или 4-бромфенил.

"Брозил" означает 4-бромбензолсульфонил.

"Терапевтически эффективное количество" означает такое количество, которое при введении млекопитающему, предпочтительно человеку для лечения рака, достаточно для эффективного лечения рака. "Лечение" рака у человека включает одно или большее количество из следующих действий:

- (1) подавление роста рака, т.е. остановку его развития,
- (2) предупреждение распространения рака, т.е. предупреждение метастазов,
- (3) ослабление рака, т.е. обеспечение ремиссии рака,

- (4) предупреждение рецидива рака и
- (5) облегчение симптомов рака.

Если соединение первого варианта осуществления настоящего изобретения вводят в качестве части комбинированной терапии совместно с одним или большим количеством других противораковых средств или с лучевой терапией, "терапевтически эффективное количество может быть меньше количества, которое было бы терапевтически эффективным при введении одного этого соединения.

"Включающий" и его грамматические варианты означают включение, а не ограничение, и они указывают на наличие указанных элементов и не исключают наличия или прибавления других элементов.

Применение соединения и способ

Заявленное соединение и его соли применимы для получения противоракового средства.

Кроме того, соединения первого варианта осуществления настоящего изобретения также являются активными цитотоксичными средствами. Поэтому они применимы для лечения рака, предпочтительно типов рака, которые лечатся канфосфамидом и его солями. Эти типы рака включают раковые заболевания млекопитающих, предпочтительно раковые заболевания людей. Раковые заболевания, которые предпочтительно лечатся, представляют собой раковые заболевания, которые чувствительны к индукторам апоптоза, а более предпочтительно раковые заболевания, при которых экспрессируется или предпочтительно сверхэкспрессируется GST P1-1. Раковые заболевания, при которых экспрессируется или сверхэкспрессируется GST P1-1 при лечении другими противораковыми средствами (т.е. не являющимися соединениями первого варианта осуществления настоящего изобретения), также предпочтительно лечатся соединениями первого варианта осуществления настоящего изобретения при использовании в комбинации с другим противораковым средством. Комбинированная терапия этого типа для канфосфамида и его аналогов описана в публикации заявки на патент US № 2004/0138140 и международной публикации РСТ № WO 2004/045593. Такие типы рака включают раковые заболевания головного мозга, молочной железы, мочевого пузыря, шейки матки, ободочной и прямой кишки, пищевода, головы и шеи, почек, легких, печени, яичников, поджелудочной железы, лейкозы, такие как острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз и волосатоклеточный лейкоз; ходжкинскую и неходжкинскую лимфомы; мезотелиомы, множественные миеломы и саркомы кости и мягких тканей. Раковые заболевания, которые предпочтительно лечатся соединениями первого варианта осуществления настоящего изобретения, включают рак молочной железы, яичников, колоректальный и немелкоклеточный рак легких.

Следующий вариант осуществления настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей указанное выше соединение, к применению этого соединения для лечения рака и для приготовления лекарственных средств, предназначенных для лечения рака, и к способам лечения рака путем введения этого соединения, обычно в терапевтически эффективном количестве.

Соединение можно вводить любым путем, подходящим для подвергающегося лечению субъекта и для характера состояния субъекта. Пути введения включают, но не ограничиваются только ими, введение с помощью инъекции, включая внутривенную, внутривенную, внутримышечную и подкожную инъекции, путем доставки через слизистую оболочку или кожу, с помощью местного нанесения, назального аэрозоля, суппозитория и т.п. или с помощью перорального введения. Фармацевтические композиции, содержащие это соединение, необязательно могут представлять собой липосомные препараты, эмульсии, препараты, предназначенные для введения лекарственного средства через слизистые оболочки, или препараты для чрескожного введения. Препараты, подходящие для каждого из этих способов введения, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20 ed., A. Gennaro, ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A., 2003. Типичные композиции представляют собой препараты для перорального введения или растворы для внутривенного вливания и содержат соединение и обычно также содержат один или большее количество фармацевтически приемлемых инертных наполнителей. Типичными дозированными формами являются таблетки, растворы для внутривенного вливания и лиофилизированные порошки для восстановления в растворы для внутривенного вливания.

Терапевтически эффективное количество соединения первого варианта осуществления настоящего изобретения составляет примерно $50\text{--}3000\text{ мг/м}^2$ площади поверхности тела, предпочтительно $500\text{--}1500\text{ мг/м}^2$. Введение можно проводить с интервалами, составляющими 1-35 дней; например примерно $500\text{--}1000\text{ мг/м}^2$ с интервалами, составляющими 1-5 недель, предпочтительно с интервалами, составляющими 1, 2, 3 или 4 недели или чаще, включая такое частое введение, как один раз в день в течение нескольких (например, 5 или 7) дней, с повторением введения каждые 2, 3 или 4 недели, или путем непрерывного вливания в течение 6-72 ч, также с повторением введения каждые 2, 3 или 4 недели; и такая гибкость режима введения легко позволяет проводить комбинированную терапию совместно с другими противораковыми средствами.

Примеры

В приведенных ниже примерах описано получение соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, и канфосфамидгидрохлорида способом, предлагаемым в настоящем изобретении, и применение

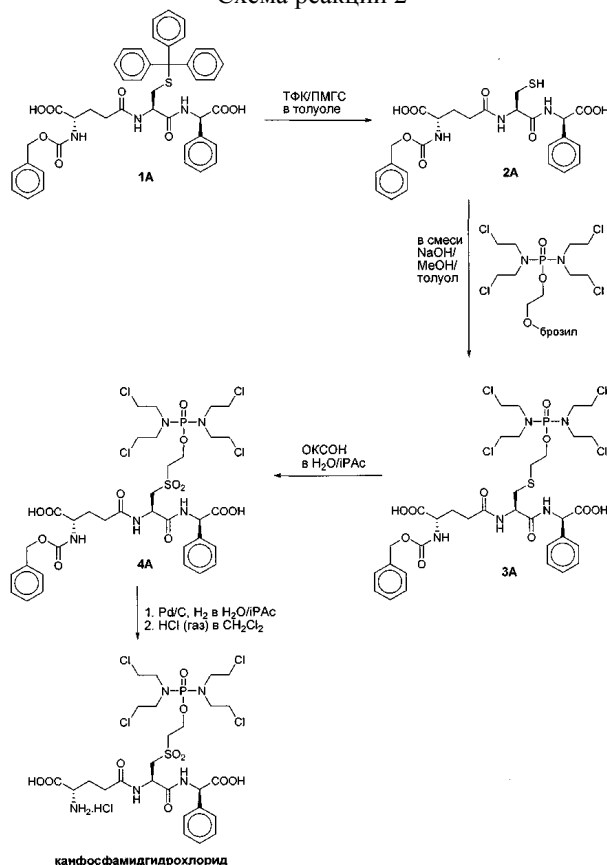
соединений первого варианта осуществления настоящего изобретения в качестве противораковых средств.

На схеме реакций 2 описано получение предпочтительных соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, и канфосфамидгидрохлорида способом, предлагаемым в настоящем изобретении. Получение N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина, соединения 1A, не представлено на схеме реакций 2, поскольку оно зависит от типа защитных групп его соединения-предшественника, но методика получения из O- α -бензил-N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина описана ниже в примере 1.

O- α -Бензил-N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин можно получить по стандартной методике синтеза пептидов. Удобный синтез с использованием легкодоступных исходных веществ, α -бензилового эфира N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутаминовой кислоты, S-трифенилметил-L-цистеина и D-фенилглицина, проводят следующим образом. α -Бензиловый эфир N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутаминовой кислоты активируют в виде N-гидроксисукцинимидного эфира по реакции с N-гидроксисукцинимидом и дициклогексилкарбодиимидом в безводном 1,4-диоксане. α -Бензиловый эфир N-гидроксисукцинимидный эфир N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутаминовой кислоты растворяют в безводном тетрагидрофуране и прибавляют к раствору S-трифенилметил-L-цистеина и триэтиламина в воде и получают O- α -бензил-N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеин. Его активируют в виде N-гидроксисукцинимидного эфира и вводят в реакцию сочетания с D-фенилглицином таким же образом, как при реакции сочетания γ -глутамин с цистеином и получают искомым O- α -бензил-N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин.

Можно применять сходные методики, но с использованием других активирующих групп или методик активации γ -карбоксигруппы глутаминовой кислоты и/или карбоксигруппы цистеина для сочетания; также можно применять методики, в которых сначала проводят сочетание цистеин-фенилглицин с последующим сочетанием полученного S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина с α -бензиловым эфиром N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутаминовой кислоты. Также можно использовать другие группы для защиты α -карбоксигруппы N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутаминовой кислоты при условии, что от α -карбоксигруппы в конечном счете удалить защитную группу и оставить без изменения остальную часть молекулы N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина.

Схема реакций 2



Пример 1. Получение канфосфамидгидрохлорида.

N- α -(Бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин, 1A.

В трехгорлую круглодонную колбу объемом 5 л, снабженную верхней механической мешалкой, термометром и капельной воронкой объемом 2 л с выравниванием давления помещали О- α -бензил-N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин (500 г, 590 ммоль) и метанол (1 л). Мешалку устанавливали на среднюю скорость и получали прозрачный раствор янтарного цвета и в течение 20 мин прибавляли водный раствор гидроксида натрия (1,2 л, 1М, 1,2 моль). В течение этого времени прибавление приводило к экзотермическому нагреванию реакционной смеси с повышением температуры реакции до 35°C и эту температуру поддерживали во время прибавления. Начинали осаждаться твердые вещества, но к концу прибавления они повторно растворялись. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 90 мин, затем метанол удаляли при пониженном давлении на роторном испарителе (40 мбар, конечная температура бани равна 35°C) и получали водный раствор динатриевой соли N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицина. Смесь помещали в трехгорлую круглодонную колбу объемом 5 л, снабженную верхней механической мешалкой, термометром и капельной воронкой объемом 2 л с выравниванием давления и затем разбавляли водой (1 л). Смесь охлаждали до 0°C в бане из воды со льдом и в течение 20 мин прибавляли водный раствор хлористо-водородной кислоты (1,3 л, 1М, 1,3 моль). За это время прибавление приводило к осаждению твердых веществ и конечное значение pH смеси становилось равным 4. Полученную взвесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C и осадок собирали вакуумным фильтрованием и промывали водой (1 л). Осадок растворяли в дихлорметане (3 л) и полученный раствор переносили в делительную воронку объемом 5 л. Водную фракцию удаляли и органическую фазу промывали водой (2 \times 1 л) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (1 л) и сушили над безводным сульфатом натрия (100 г). После осветления растворитель удаляли при пониженном давлении (40 мбар, 35°C) на роторном испарителе и получали вспененное вещество янтарного цвета. Затем этот твердый продукт сушили в течение ночи (40 мбар, 40°C) и получали N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин, 1A, в виде почти белого порошкообразного вещества (400 г, выход 89%). Анализ с помощью ТСХ (тонкослойная хроматография) показал наличие одного пятна (R_f =0,50, силикагель, 1:4 метанол/хлороформ). Протонный спектр ЯМР (ДМСО- d_6) согласовывался с предложенной структурой. Анализ с помощью ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) привел к одному главному пику (время удерживания = 22,1 мин; от 20:80 ацетонитрил/0,1М водный раствор $NH_4H_2PO_4$ до 80:20 ацетонитрил/0,1М водный раствор $NH_4H_2PO_4$ в течение 30 мин; скорость потока = 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм; 25°C).

N- α -(Бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин, 2A.

В трехгорлую круглодонную колбу объемом 12 л с кожухом, снабженную устройством для продувки азотом, верхней механической мешалкой, термометром и капельной воронкой с выравниванием давления помещали N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-S-трифенилметил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин (900 г, чистота 93,7%, 843,3 г, 1,11 моль) и толуол (3,6 л). После продувки азотом смесь перемешивали и прибавляли трифторуксусную кислоту (ТФК, 824 мл, 11,1 моль). Поли(метилгидросилоксан) (ПМГС, 270 г) прибавляли в течение 1 ч, поддерживая температуру, равной 25°C, и реакционную смесь перемешивали в течение еще 17 ч. Затем реакцию останавливали путем прибавления смеси 1:1 гептан/метил-трет-бутиловый эфир (5,4 л) в течение 1,5 ч и осаждался N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин. После перемешивания в течение еще 2 ч смесь фильтровали и осадок промывали гептаном (3,6 л) и сушили в вакууме при 40°C.

N- α -(Бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин.

Точная масса: 517,15; MS (API-ES⁺): m/z 518 (M+H⁺); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,78 (1H, d, J = 7,2 Гц, NH), 8,09 (1H, d, J = 8,0 Гц, NH), 7,62 (1H, d, J = 8,0 Гц, NH), 7,36 (8H, m), 7,21 (2H, m), 5,35 (1H, d, J = 7,6 Гц), 5,03 (2H, s), 4,56 (1H, m), 3,98 (1H, m), 2,68 (1H, m), 2,61 (1H, m), 2,26 (2H, m), 2,02 (1H, m), 1,78 (1H, m).

N- α -(Бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-3-[[2-[[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]тио]-L-аланил-2(R)-фенилглицин, 3A.

В трехгорлую круглодонную колбу объемом 12 л с кожухом, снабженную устройством для продувки азотом, верхней механической мешалкой, термометром и капельной воронкой с выравниванием давления помещали гидроксид натрия (49,46 г, 1,24 моль) и метанол (1,99 л) и перемешивали в атмосфере азота до растворения и затем охлаждали примерно до 5°C. Прибавляли N- α -(бензилоксикарбонил)-L- γ -глутамил-L-цистеинил-2(R)-фенилглицин (398,5 г, чистота 80,3%, 320 г, 0,62 моль), а затем 2-(4-бромбензолсульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетраakis(2-хлорэтил)фосфородиамидат (1487,5 г, чистота 63,3%, 941,6 г, 1,55 моль в виде раствора в толуоле концентрации примерно 1М. В атмосфере азота в течение 5 ч прибавляли раствор гидроксида натрия (56,88 г, 1,42 моль) в метаноле (1,99 л), поддерживая температуру реакционной смеси при 5°C, и реакционную смесь перемешивали при этой температуре в течение еще 17 ч. Продолжая охлаждение, прибавляли воду (1,12 л), значение pH реакционной смеси доводили до 6,9 с помощью 1М фосфорной кислоты, прибавляли толуол (1,92 л) и прибавляли воду (2,72

л). Реакционную смесь перемешивали, затем фазы разделяли и толуольную фазу (содержащую избыток 2-(4-бромбензолсульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидата) удаляли. Водный слой промывали толуолом (1,92 л), фазы разделяли и толуольную фазу удаляли. Затем водный слой перегоняли в вакууме для удаления метанола, поддерживая температуру смеси ниже 35°C. Затем прибавляли изопропилацетат (iPAc, 1,6 л), значение pH доводили до 6,9, фазы разделяли и изопропилацетатную фазу (содержащую 2-(4-бромбензолсульфонилокси)этил-N,N,N',N'-тетракис(2-хлорэтил)фосфородиамидат) удаляли. Прибавляли изопропилацетат (3,2 л), значение pH доводили до 4,8-4,85, фазы разделяли и изопропилацетатную фазу (содержащую N-α-(бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]тио]-L-аланил-2(R)-фенилглицин) сохраняли. Изопропилацетат (0,64 л) прибавляли к водной фазе, значение pH доводили до 4,8-4,85, фазы разделяли и изопропилацетатную фазу объединяли с полученной ранее изопропилацетатной фазой при pH 4,8-4,85. К объединенным изопропилацетатным фазам прибавляли воду (1,6 л), значение pH доводили до 5,25-5,3, фазы разделяли и водную фазу удаляли. Промывку водой повторяли и после отделения водной фазы до проведения последующей обработки изопропилацетатную фазу перегоняли в вакууме до уменьшения объема смеси примерно до 3,15 л. N-α-(Бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]тио]-L-аланил-2(R)-фенилглицин можно выделить из раствора путем удаления растворителя.

N-α-(Бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]тио]-L-аланил-2(R)-фенилглицин.

Точная масса: 887,15; MS (API-ES⁺): m/z 890, 888 (M+H⁺); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,93 (1H, d, J = 7,8 Гц, NH), 8,13 (1H, d, J = 8,6 Гц, NH), 7,60 (1H, d, J = 8,2 Гц, NH), 7,36 (10H, m), 5,35 (1H, d, J = 7,8 Гц), 5,03 (2H, s), 4,66 (1H, m), 3,97 (3H, m), 3,68 (8H, m), 3,30 (8H, m), 2,76 (3H, m), 2,57 (1H, m), 2,25 (2H, m), 1,99 (1H, m), 1,76 (1H, m).

N-α-(Бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицин, 4A.

В трехгорлую круглодонную колбу объемом 12 л с кожухом, снабженную устройством для продувки азотом, верхней механической мешалкой, термометром и капельной воронкой с выравниванием давления помещали раствор N-α-(бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]тио]-L-аланил-2(R)-фенилглицина (442,6 г, 0,50 моль) в изопропилацетате (2,65 л), полученный на предыдущей стадии. При перемешивании в атмосфере азота, поддерживая температуру равной 20-30°C, прибавляли раствор 2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄ (ОКСОНTM) (663,9 г, 1,08 моль) в воде (2,66 л) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи до завершения окисления. Водную фазу отделяли и удаляли и изопропилацетатную фазу трижды промывали водой (885 мл) и после каждой промывки с помощью индикаторной бумаги крахмал/КІ проверяли наличие персульфатов. К изопропилацетатной фазе прибавляли изопропилацетат (2,65 л) и затем объединенный раствор перегоняли до уменьшения объема смеси примерно до 1,77 л. Затем прибавляли изопропилацетат (1,77 л), затем с помощью титрования по Карлу Фишеру проверяли, не превышает ли содержание воды 0,2%. Смесь перемешивали в течение ночи и осадившийся N-α-(бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицин отфильтровывали и сушили при 35°C.

N-α-(Бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицин.

Точная масса: 919,14; MS (API-ES⁺): m/z 924, 922, 920 (M+H⁺); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,81 (1H, d, J = 7,4 Гц, NH), 8,41 (1H, d, J = 8,2 Гц, NH), 7,61 (1H, d, J = 8,2 Гц, NH), 7,36 (10H, m), 5,30 (1H, d, J = 7,4 Гц), 5,03 (2H, s), 4,94 (1H, m), 4,25 (2H, m), 3,98 (1H, m), 3,68 (8H, m), 3,54 (3H, m), 3,33 (9H, m), 2,25 (2H, m), 1,99 (1H, m), 1,78 (1H, m).

Канфосфамидгидрохлорид.

В автоклаве объемом 2 л палладий на угле (5%, 26,25 г) в изопропилацетате (350 мл) предварительно восстанавливали с помощью трех циклов продувки азотом (вакуум, подача азота, откачка) и затем с помощью трех циклов подачи (3,4 бар) и откачки водорода и после последнего прибавления водорода смесь перемешивали в течение 30 мин, а затем повторно продували азотом. N-α-Бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицин (190,6 г, чистота 91,89%, 175 г, 190 ммоль) растворяли в изопропилацетате (700 мл) и воде (53,9 мл) и раствор помещали в автоклав. Повторяли три цикла продувки азотом, а затем проводили два цикла прибавления и откачки водорода, затем в автоклав подавали водород под давлением 3,4 бар, нагревали до 30°C и выдерживали при этой температуре в течение 7,7 ч, проследивая за завершением реакции с помощью ВЭЖХ. Реакционную смесь фильтровали через диатомовую землю (ЦЕЛИТTM) для удаления катализатора и фильтр промывали изопропилацетатом (2×175 мл). Объединенные фильтраты и промывочные растворы дегидратировали путем перегонки в вакууме и повторного прибавления изопропилацетата, затем повторно концентрировали до конечной массы раствора, равной 485,7 г. К раствору прибавляли дихлорметан (350 мл), а затем прибавляли газообразный хлорид водорода (8,37 г) и разбавляли ме-

тил-трет-бутиловым эфиром (858 мл). После перемешивания в течение 2,5 ч реакционную смесь фильтровали и оставшийся канфосфамидгидрохлорид промывали метил-трет-бутиловым эфиром (2×576 мл) и сушили при 55°C в вакууме.

Канфосфамидгидрохлорид.

Точная масса равна 785,10; MS (API-ES⁺): m/z 800, 788, 786 (M+H⁺); ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,81 (1H, d, J = 7 Гц, NH), 8,62 (1H, d, J = 7 Гц, NH), 8,4 (2H, bs), 7,35 (5H, m), 5,31 (1H, d, J = 7 Гц), 4,95 (1H, m), 4,36 (2H, J = 6Hz, q), 3,87 (1H, J = 6Hz, t), 3,66 (8H, m), 3,57 (3H, m), 3,31 (9H, m), 2,50 (1H, s), 2,35 (1H, m), 2,02 (2H, m).

Пример 2. Цитотоксическая активность N-α-(бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2(R)-фенилглицина, 4A.

Этот пример иллюстрирует эффективное воздействие N-α-(бензилоксикарбонил)-L-γ-глутамил-3-[[2-[[бис[бис(2-хлорэтил)амино]фосфинил]окси]этил]сульфонил]-L-аланил-2-фенил-(2R)-глицина, соединения 4A, на линии клеток рака человека *in vitro*. Сделан вывод о том, что эти результаты прогнозируют эффективность при химиотерапии рака человека, поскольку другие противораковые средства, изученные в этом исследовании, обнаружили противораковую активность при лечении людей.

Линии клеток рака человека HL-60 (промиелоидный миелоцитарный лейкоз) и MX-1 (карцинома молочной железы) получали из Национального института рака, расположенного по адресу: Bethesda, Maryland, U.S.A. Набор для анализа CellTiter-Glo получали от фирмы Promega Corporation, расположенной по адресу: Madison, Wisconsin, U.S.A, и использовали в соответствии с инструкциями изготовителей. Все исследования проводили в лунках трижды с использованием растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) в качестве контроля. Степень роста клеток выражали в процентах от интенсивности сигнала для контрольных лунок, содержащих растворитель.

Клетки в фазе логарифмического роста триптинизировали, собирали с помощью центрифугирования и повторно суспендировали в небольшом объеме свежей среды и плотность жизнеспособных клеток определяли после окрашивания посредством Тугран Blue. Клетки разводили в свежих средах (5×10⁴ клеток/мл в случае клеток HL-60 и 3×10³ клеток/мл в случае клеток MX-1). Соединение 4A (концентрация от 0,1 до 200 мкМ, растворенные в ДМСО, 50 мкл) прибавляли сразу же после разведения до конечной концентрации ДМСО, равной 0,5%, затем суспензии помещали по 150 мкл/лунка в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение нескольких часов для обеспечения фиксации в случае прилипающих клеток. Клетки выращивали в течение примерно трех времен удвоения (3 дня). Затем клетки собирали с помощью центрифугирования и 100 мкл надосадочной жидкости культуры заменяли на реагент CellTiter-Glo. Затем инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и планшеты считывали с помощью люминометра. Активность соединения 4A, выраженная с помощью IC₅₀, по отношению к линиями клеток составляла: HL-60: 2,2 мкМ и MX-1: 34,6 мкМ. В этом исследовании обнаружено, что многие соединения являются столь же активными, как и канфосфамид.

Пример 3. Состав и терапевтические примеры.

Твердый препарат для перорального введения готовят путем объединения следующих компонентов:

Соединение 4A	25,0 мас./мас.%
Стеарат магния	0,5 мас./мас.%
Крахмал	2,0 мас./мас.%
Гидроксипропилметилцеллюлоза	1,0 мас./мас.%
Микрокристаллическая целлюлоза	71,5 мас./мас.%

и смесь прессуют в таблетки или помещают в капсулы из твердого желатина, содержащие, например, 250 мг соединения 4A. При необходимости на таблетки можно нанести покрытие путем нанесения суспензии пленкообразующего агента (например, гидроксипропилметилцеллюлозы), пигмента (например, диоксида титана) и пластификатора (например, диэтилфталата) и высушить пленку путем выпаривания растворителя.

Препарат для ВВ (внутривенного) введения готовят путем растворения соединения 4A, например, в виде фармацевтически приемлемой соли, при концентрации, равной 1% мас./об., в забуференном фосфатом физиологическим растворе; и раствор стерилизуют, например, путем стерильного фильтрования и герметично упаковывают в стерильные емкости, содержащие, например, 100 мг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении.

Альтернативно, лиофилизированный препарат готовят путем растворения соединения 4A также, например, в виде фармацевтически приемлемой соли, в подходящем буфере, например в фосфатном буфере, из забуференного фосфатом физиологического раствора, указанного выше, стерилизации раствора и его расфасовки в подходящие стерильные флаконы, лиофилизации раствора для удаления воды и герметизации флаконов. Лيوфилизированный препарат восстанавливают путем прибавления стерильной воды и восстановленный раствор для введения можно дополнительно разбавить таким раствором, как 0,9% раствор хлорида натрия для внутривенного вливания или 5% раствор декстрозы для внутривенного

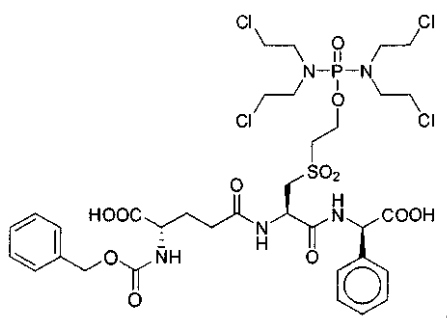
вливания.

Соединение 4А, разбавленное в 5% растворе декстрозы для внутривенного вливания, внутривенно в течение 30 мин вводят пациенту, страдающему от метастазирующей карциномы яичника, при начальной дозе, равной 100 мг/м²; и эту дозу повышают до 250, 500, 750 и 1000 мг/м². Соединение вводят с интервалами в 1 неделю. Такую же повышающуюся дозу вводят с 2- и 3-недельными интервалами другим пациентам, страдающим от того же типа рака.

Хотя настоящее изобретение описано с помощью конкретных вариантов осуществления и примеров, для специалиста с общей подготовкой в данной области техники на основании своей подготовки и настоящего описания должно быть очевидно, что в настоящем изобретении также применимы эквиваленты конкретных описанных материалов и способов; и подразумевается, что все такие эквиваленты включены в приведенную ниже формулу изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



или его соль.

2. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по п.1 или его соль.
3. Применение соединения по п.1 или его соли для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака.
4. Способ лечения рака у млекопитающего, включающий введение млекопитающему соединения по п.1 или его соли.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2