



(19) **UA** (11) **80 992** (13) **C2**
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: а200504629, 20.10.2003

(24) Дата начала действия патента: 26.11.2007

(30) Приоритет: 18.10.2002 GB PCT/GB02/004735
26.02.2003 GB 0304367.6
24.06.2003 GB 0314725.3

(46) Дата публикации: 26.11.2007 C07K 7/08
20060101A FI20070717RHUA C07K
14/435 20060101C LI20070703RHUA
A61K 38/15
20060101C LN20070717RHUA A61P
35/00 20060101C LI20070115RMUA

(86) Заявка PCT:
PCT/US03/33207, 20031020

(72) Изобретатель:

Ферклот Глинн Томас, US,
Элисес Марьяно, US,
Сасак Халина, US,
Авилес Марин Пабло Мануэль, ES,
Куэвас Марчанте Мария дель Кармен, ES

(73) Патентовладелец:

ФАРМА МАР, С.А.У., ES

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СОЕДИНЕНИЕ КАХАЛАЛИДА, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ

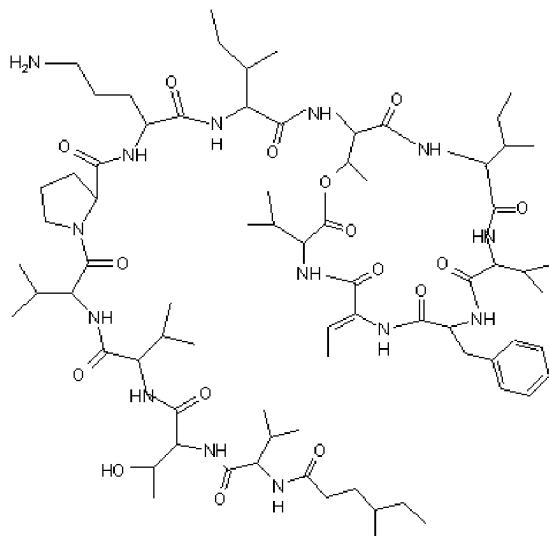
(57) Реферат:

Изобретение касается нового
противоопухолевого соединения кахалалида, в
частности аналога кахалалида F, формулы I

Формула I,

его применения и способа получения.

Официальный бюлетьн "Промышленная
собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные
модели, топографии интегральных микросхем",
2007, N 19, 26.11.2007. Государственный
департамент интеллектуальной собственности
Министерства образования и науки Украины.





(19) **UA** (11) **80 992** (13) **C2**
(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: a200504629, 20.10.2003

(24) Effective date for property rights: 26.11.2007

(30) Priority: 18.10.2002 GB PCT/GB02/004735
26.02.2003 GB 0304367.6
24.06.2003 GB 0314725.3

(46) Publication date: 26.11.2007 C07K 7/08
20060101AFI20070717RHUA C07K
14/435 20060101CLI20070703RHUA
A61K 38/15
20060101CLN20070717RHUA A61P
35/00 20060101CLI20070115RMUA

(86) PCT application:
PCT/US03/33207, 20031020

(72) Inventor:

Faircloth Glynn Thomas, US,
Elices Mariano, US,
Sasak Halina, US,
Aviles Marin Pablo Manuel, ES,
Cuevas Marchante Maria del Carmen, ES

(73) Proprietor:

PHARMA MAR, S.A.U., ES

(54) **KAHALAIDE ANTITUMORAL COMPOUND, USE THEREOF AND PROCESS FOR THE PREPARATION**

(57) Abstract:

The present invention is directed to new kahalalide antitumoral compounds, in particular to analogues of kahalalide F, useful as antitumoral, antiviral, antifungal agents and in the treatment of psoriasis.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2007, N 19, 26.11.2007. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **80 992** (13) **C2**
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
a200504629, 20.10.2003

(24) Дата набуття чинності: 26.11.2007

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 18.10.2002 GB PCT/GB02/004735
26.02.2003 GB 0304367.6
24.06.2003 GB 0314725.3

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 26.11.2007C07K 7/08
20060101AFI20070717RHUA C07K
14/435 20060101CLI20070703RHUA
A61K 38/15
20060101CLN20070717RHUA A61P
35/00 20060101CLI20070115RMUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/US03/33207, 20031020

(72) Винахідник(и):

Ферклот Глінн Томас, US,
Елісес Марьяно, US,
Сасак Халіна, US,
Авілес Марін Пабло Мануель, ES,
Куевас Марчанте Марія дель Кармен, ES

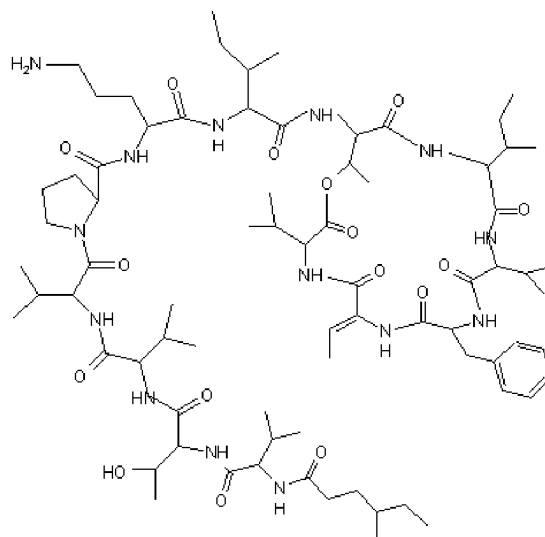
(73) Власник(и):

ФАРМА МАР, С.А.У., ES

(54) ПРОТИПУХЛИННА СПОЛУКА КАХАЛАЛІДУ, ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ ТА СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується нової протипухлинної
сполуки кахалаліду, зокрема аналога кахалаліду F,
формули I



Формула I,
її застосування та способу одержання.

Опис винаходу

Даний винахід пов'язаний з новими протипухлинними сполуками кахалаліду, зокрема, з аналогами кахалаліду F, де аліфатична 5-метилгексанова кислота заміщена 4-метилгексановою кислотою, фармацевтичними композиціями, що містять їх, і їх застосуванням як протипухлинних, антивірусних, протигрибкових агентів і при лікуванні псоріазу.

Сполуки кахалаліду являють собою пептиди, виділені з гавайських морських трав'янистих видів молюска *Elysia rufescens* і його корму, зеленої водорості *Bryopsis* sp. Кахалаліди A-F описані у [Hamman et al., J. Am. Chem. Soc, 1993, 115, 5825-5826].

Кахалаліди A-G описані у [Hamann, M. et al., J. Org. Chem, 1996, 61, 6594-6600: "Kahalalides: bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis* sp."].

Кахалаліди H і J описані у [Scheuer P. J. et al, J. Nat. Prod. 1997, 60, 562-567: "Two acyclic kahalalides from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens*"].

Кахалалід O описаний у [Scheuer P. J. et al., J. Nat. Prod. 2000, 63(1) 152-4: A new depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia ornata* and the green alga *Bryopsis* species"].

У зв'язку з кахалалідом K [див. публікацію Kan, Y. et al., J. Nat. Prod. 1999 62(8) 1169-72: "Kahalalide K: A new cyclic Depsipeptide from the hawaiian green alga *bryopsis* species"].

Що стосується пов'язаних з ним публікацій, хдив. також Goetz et al., Tetrahedron, 1999, 55; 7739-7746: "The absolute stereochemistry of Kahalalide F"; Albericio, F. et al. Tetrahedron Letters, 2000, 41, 9765-9769: "Kahalalide B. Synthesis of a natural cyclodepsipeptide"; Becerro et al. J. Chem. Ecol. 2001, 27(11), 2287-99: "Chemical defenses of the sarcoglossan mollusk *Elysia rufescens* and its host Alga *bryopsis* sp."i.

Серед кахалалідних сполук кахалалід F є найбільш багатообіцяючим через його протипухлинну активність. Він має складну структуру, що включає в себе шість амінокислот в циклічній частині і екзоциклічний ланцюжок з семи амінокислот з кінцевою групою з жирної кислоти. Про його активність проти клітинних культур *in vitro* клітин A-549 легеневої карциноми людини і клітин HT-29 кишкової карциноми людини повідомлялося в [публікації EP 610078]. Було також показано, що кахалалід F має протівірусні і протигрибкові властивості.

У передклінічних дослідженнях *in vivo* було показано, що максимально переносима доза (МПД) однократної болюсної в/в ін'єкції кахалаліду F у самиць мишей становить 280мкг/кг. Незважаючи на те, що однократні дози трохи вищі за МПД в/в були виключно токсичні, так що у тварин виявлялися ознаки нейротоксичності, що закінчувалися смертельним виходом, дозу в 280мкг/кг кахалаліду F можна було вводити повторно, за схемою п'ять введення по одному введенню в день, без будь-яких ознак гострої токсичності. [Див. Supko, F. et al., Proceedings of the 1999 AACR NCI EORTC International Conference, abstract 315: "Preclinical pharmacology studies with the marine natural product Kahalalide F"].

У [Міжнародній заявці WO 0236145] описані фармацевтичні композиції, що містять кахалалід F, і нові варіанти застосування цієї сполуки в лікуванні раку - ця публікація у всій своїй повноті включена в даний опис у вигляді посилання.

У [Міжнародній заявці WO 0333012], від дати подачі якої вимагається пріоритет за даною заявкою, описане клінічне застосування сполук кахалаліду в онкології, і ця публікація також у всій своїй повноті включена в даний опис у вигляді посилання.

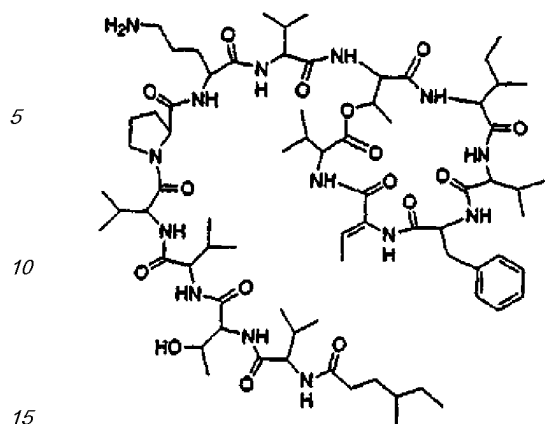
У [патенті Великобританії GB 0304367], від дати подачі якого також вимагається пріоритет за даною заявкою, описане застосування сполук кахалаліду при лікуванні псоріазу і споріднених до нього сполук, і ця публікація також у всій своїй повноті включена в даний опис у вигляді посилання.

Синтез і цитотоксичні активності природних і синтетичних сполук кахалаліду описані в [Міжнародній заявці WO 0158934], яка у всій своїй повноті включена в даний опис у вигляді посилання. У [документі WO 0158934] описаний синтез кахалаліду F, а також сполук із подібною структурою, в яких кінцевий ланцюг з жирної кислоти замінений іншими жирними кислотами.

Як і раніше відчувається необхідність в створенні нових протипухлинних сполук, зокрема, додаткових сполук кахалаліду з поліпшеними властивостями.

Автори винаходу несподівано виявили, що одна із сполук-аналогів кахалаліду має досить перспективну активність і виявляє підвищену протипухлинну дію на моделях *in vivo*.

Даний винахід пов'язаний із сполукою формули 1:

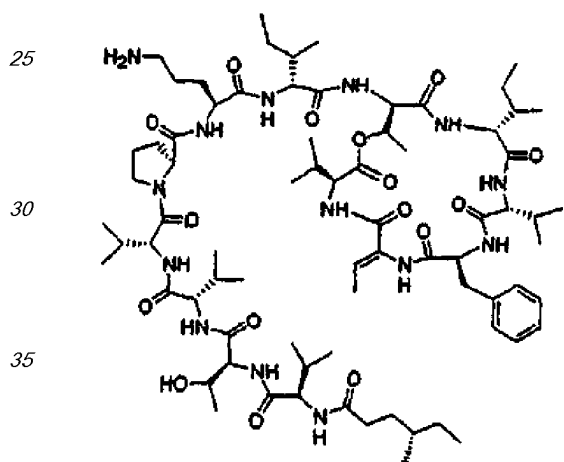


Формула 1

і її фармацевтично прийнятними солями, проліками, таутомерами і сольватами.

Така сполука відповідає кахалаліду F з 4-метилгексановим ланцюгом у вигляді кінцевої жирної кислоти, і надалі в даному описі буде позначатися як 4-метилгексановий KF.

У переважному втіленні даний винахід пов'язаний із сполукою, що містить (4S)-метилгексанову кислоту, що має формулу 2:



Формула 2

і її фармацевтично прийнятними солями, пролінами, таутомерами і сольватами. Така сполука буде надалі в даному описі позначатися як (4S)-метилгексановий КФ.

Даний винахід пов'язаний з фармацевтичною композицією, що містить визначену вище сполуку і фармацевтично прийнятний носій, наповнювач або розріджувач.

Даний винахід додатково пов'язаний зі способом лікування будь-якої тварини, особливо людини, ураженої злоякісною пухлиною або псоріазом, причому цей спосіб включає в себе введення ураженому захворюванням індивіду терапевтично ефективної кількості сполуки, що визначається вище.

Даний винахід може бути використаний, зокрема, для лікування пацієнтів з рефрактерними злоякісними пухлинами, які відрізняються незадовільною реакцією на інші терапевтичні впливи. Зокрема, композиції згідно з винаходом можуть бути використані після того як були використані інші види хіміотерапії, які не мали належної дії.

Даний винахід направлений, зокрема, на лікування пацієнтів, уражених злоякісною пухлиною перемішувової залози, злоякісною пухлиною молочної залози, гепатоцелюлярною карциномою, меланою, злоякісною пухлиною ободової і прямої кишки, злоякісною пухлиною нирки, злоякісною пухлиною яєчника, злоякісною пухлиною NSCL (карцинома легень), злоякісною пухлиною епітелію, злоякісною пухлиною підшлункової залози і пухлинами, для яких характерна підвищена експресія онкогену Her2/neu.

У іншому аспекті даний винахід направлений на застосування визначеної вище сполуки для виробництва лікарського засобу. У переважному втіленні, вказаний лікарський засіб призначений для лікування злоякісної пухлини, псоріазу, вірусної інфекції або грибкової інфекції.

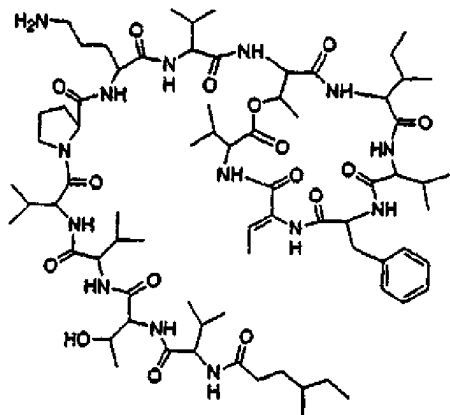
Даний винахід додатково пов'язаний з наборами, що включають в себе роздільні контейнери, що містять фармацевтичну композицію, яка містить визначену вище сполуку і відновлюючий агент. Способи відновлення також забезпечуються даним винаходом.

Даний винахід направлений також на спосіб отримання визначеної вище сполуки. У способі отримання переважно використовується як вихідна сполука 4-метилгексанова кислота. У переважному втіленні,

4-метилгексанова кислота являє собою (4S)-метилгексанову кислоту. У найбільш переважному втіленні цей спосіб являє собою твердофазний синтез.

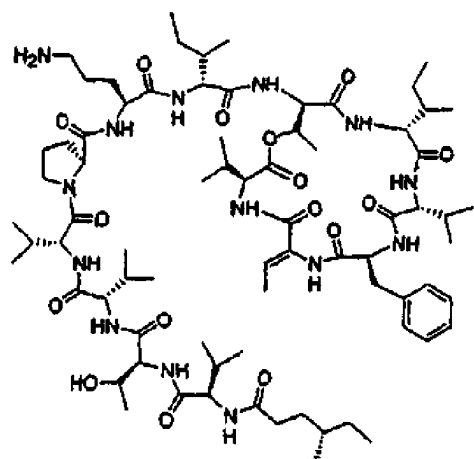
Автори винаходу ідентифікували аналоги кахалаліду F, які проявляють значно більш поліпшену активність в порівнянні з кахалалідом F. Як показано в порівняльних прикладах, 4-метилгексановий кахалалід F нез'ясованим чином проявляє поліпшену ефективність на *in vivo* моделях злоякісних пухлин. Це представляється ще більш несподіваним з точки зору малих структурних відмінностей між 4-метилгексановим кахалалідом F і 5-метилгексановим кахалалідом F.

Сполукою згідно з винаходом є кахалалід F з ланцюгом 4-метилгексанової жирної кислоти замість 5-метилгексанової, що має структуру відповідно до формули 1:



Формула 1

Зокрема, є переважним, щоб ця сполука мало стереохімію, що визначається формулою 2:



Формула 2

Проте, сполуки згідно з винаходом мають асиметричні центри, і, отже, існують в різних енантімерних і діастереомерних формах. Даний винахід пов'язаний із застосуванням всіх оптичних ізомерів і стереоізомерів сполук згідно з винаходом і їх сумішей, а також з фармацевтичними композиціями, що містять їх, і зі способами лікування, в яких вони використовуються.

Для зручності автори винаходу посилаються на сполуки згідно з винаходом, а саме на сполуки 1 і 2, як на сполуки 4-метилгексилкахалаліду F, або сполуки 4-мегексKF. Переважно сполуки 4-мегексKF згідно з винаходом є сполуками, які у великій мірі вільні, по суті вільні або повністю вільні від інших сполук кахалаліду. Наприклад, сполука 4-мегексKF згідно з винаходом переважно вільна від кахалаліду F, що має 5-метилгексильний бічний ланцюг. Зокрема, 4-мегексKF згідно з винаходом переважно містить найбільше 25%, 10%, 5%, 2%, 1% або 0,5%, або менш ніж 0,5% будь-якого іншого кахалаліду, особливо кахалаліду F. В близькому аспекті, 4-мегексKF згідно з винаходом забезпечується по суті в чистому вигляді. Така сполука 4-мегексKF, в деякій мірі вільна від інших кахалалідів, особливо підходить для фармацевтичних композицій і способів лікування згідно з винаходом.

Даний винахід включає в себе сполуки згідно з винаходом і їх фармацевтично прийнятні солі, в яких один або більше атомів водню, вуглецю або інших атомів заміщені їхніми ізотопами. Такі сполуки можуть бути використані як засоби для наукових досліджень і діагностики при вивченні метаболізму і фармакокінетики, а також в аналізах зв'язування.

У даному описі сполуки згідно з винаходом, включаючи сполуки формули 1 і 2, визначаються як сполуки, які включають в себе також і фармацевтично прийнятні похідні або проліки. "Фармацевтично прийнятне похідне або

проліки" означає будь-яку фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сіль складного ефіру або інше похідне сполуки згідно з винаходом, яке при введенні реципієнту здатне забезпечити (прямо або непрямо) сполуку згідно з винаходом або його метаболіт або залишок. Особливо переважними похідними і проліками є такі, які збільшують біодоступність сполук згідно з винаходом, коли такі сполуки вводяться пацієнту (наприклад, додаючи сполуці, що вводиться перорально, властивість підвищеної абсорбції в крові), поліпшують доставку батьківської сполуки до конкретного біологічного компартменту, підвищують розчинність, створюючи можливість введення шляхом ін'єкції, змінюють метаболізм або змінюють швидкість екскреції.

Солі сполук згідно з винаходом включають в себе адитивні солі, отримані з азоту в сполуці формули 1 або 2. Терапевтична активність, як визначено в даному описі, пов'язана з фрагментом, отриманим із сполуки згідно з винаходом, а ідентичність компонента, що залишився, не так важлива, хоч для терапевтичних і профілактичних цілей переважно, щоб він був фармацевтично прийнятним для пацієнта. Приклади фармацевтично прийнятних кислотно-адитивних солей включають в себе такі кислотно-адитивні солі, які отримані з мінеральних кислот, таких хлористоводнева, бромистоводнева, фосфорна, метафосфорна, азотна і сірчана кислоти, органічних кислот, таких як винна, оцтова, трифтороцтова, лимонна, яблучна, молочна, фумарова, бензойна, гліколева, глюконова, янтарна і метансульфонова і арилсульфонова, наприклад пара-толуолсульфонова, кислоти. Переважною сіллю є сіль трифтороцтової кислоти.

Сполуки згідно з винаходом можуть бути отримані відповідно до синтетичних процесів, описаних в [міжнародній заявці WO 0158934], наприклад, при додаванні відповідної (S) або (R) 4-метилгексанової кислоти замість 5-метилгексанової в прикладі 3 [міжнародної заявки WO 0158934]. Отже, даний винахід розповсюджується також на спосіб отримання сполуки формули 1 або 2. В цьому способі як вихідний матеріал використовується 4-метилгексанова кислота. Найбільш переважним вихідним матеріалом є (4S)-метилгексанова кислота. Спосіб синтезу переважно являє собою спосіб твердофазного синтезу. Додаткові подробиці синтезу наведені в прикладах.

Спосіб згідно з винаходом може бути здійснений на основі вихідних матеріалів в енантіо-, стереоконтрольованому і швидкому режимі, з використанням переваг методології твердофазного синтезу, де протягом всіх операцій синтезу молекула в конструкції пов'язана з нерозчинною підкладкою.

Фармацевтичні композиції сполук згідно з винаходом можуть бути адаптовані для будь-якого бажаного шляху введення, наприклад, перорального (включаючи булальне або під'язичне), ректального, назального, місцевого (включаючи булальне, під'язичне або трансдермальне), вагінального або парентерального (включаючи підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньовенне або внутрішньодермальне) шляхів введення. Такі композиції можуть бути отримані будь-яким способом, відомим в галузі фармацевції, наприклад, шляхом асоціації активного інгредієнту з носієм (носіями) або наповнювачем (наповнювачами).

Переважні фармацевтичні композиції сполук згідно з винаходом включають в себе рідину (розчини, суспензії або емульсії) з відповідним складом для внутрішньовенного введення, і вони можуть містити сполуки в чистому вигляді або в комбінації з будь-яким носієм або іншими фармацевтично активними сполуками. Подальшим путівником в зв'язку з фармацевтичними композиціями може служити [міжнародна заявка WO 0236145], яка у всій її повноті включена в даний опис у вигляді посилання.

Таким чином, комбінація неіонної поверхнево-активної речовини і органічної кислоти є прийнятною для використання з агентом-наповнювачем для отримання ліофілізованої форми сполуки згідно з винаходом, прийнятною для відновлення. Відновлення переважно проводять шляхом змішування емульсифікуючого солюбілізатора, алканолу і води.

Ліофілізовані композиції переважно включають в себе в основному наповнювач, наприклад, щонайменше 90% або щонайменше 95% агента-наповнювача. Приклади агентів-наповнювачів добре відомі і включають в себе сахарозу і маніт. Можуть бути використані також і інші агенти-наповнювачі.

Неіонною поверхнево-активною речовиною в ліофілізованій композиції переважно є складний ефір сорбітану, більш переважно - складний ефір поліетиленсорбітану, такий як поліоксіетиленсорбітаналканоат, зокрема, поліоксіетиленсорбітанмоноолеат, наприклад, полісорбат-80. Неіонна поверхнево-активна речовина звичайно становить невеликий відсоток композиції, наприклад, від 0 до 5% композиції, наприклад, від 2 до 3 або 4% композиції.

Органічною кислотою в складі ліофілізованої композиції звичайно є аліфатична кислота, переважно гідроксикарбонова кислота, а більш переважно - гідроксиполікарбонова кислота, зокрема, лимонна кислота. Органічна кислота звичайно становить невеликий відсоток композиції, наприклад, від 0 до 5% композиції, наприклад, від 2 до 3 або 4% композиції.

Кількість сполуки згідно з винаходом в складі ліофілізованої композиції звичайно складає менше за 1% або частіше менше ніж 0,1% суміші. Прийнятна кількість міститься в межах від 50 до 200мкг, наприклад, приблизно 100мкг на 100мг композиції.

Емульсифікуючий солюбілізатор для відновлюючого агента в прийнятному випадку містить складний ефір поліетиленгліколю, особливо складний ефір жирної кислоти, більш переважно - ПЕГ-олеат, такий як ПЕГ-олеат-35. Емульсифікуючий солюбілізатор в прийнятному випадку складає від 0 до 10% поновлюючого агента, звичайно приблизно від 3 до 7%, наприклад, приблизно 5%. Алаканол звичайно є етанолом, який в прийнятному випадку складає від 0 до 10% відновлюючого агента, звичайно приблизно від 3 до 7%, наприклад, приблизно 5%. Іншу частину відновлюючого агента складає вода, і в результаті отримують відновлений розчин, підходящий для внутрішньовенної ін'єкції.

Подальше розбавлення відновленого розчину 0,9% фізіологічним розчином може бути зроблене для інфузії кахалалідної сполуки. Відповідне для інфузії обладнання переважно включає в себе скляний контейнер, який є

переважнішим поліетиленового. Трубки переважно повинні бути зроблені з сілікону.

Далі, переважний відновлюючий агент складає від 2 до 7%, наприклад, приблизно 5%, емульсифікуючого солюбілізатора; від 2 до 7%, наприклад, приблизно 5%, спирту; а решта - вода.

Композиції можуть бути представлені в контейнерах з одиначною дозою або в контейнерах з багаторазовою дозою, наприклад, закритих ампулах і флаконах, і можуть зберігатися в заморожено-висушеному (ліофілізованому) стані, потребує лише додаткового стерильного рідкого носія, наприклад, води для ін'єкцій, що використовується безпосередньо перед вживанням.

Таким чином, даний винахід додатково пов'язаний з наборами, що включають в себе окремі контейнери, що містять ліофілізовану композицію і відновлювальний агент. Опис способів відновлення також включений в набір.

Введення сполук або композицій згідно з винаходом проводиться шляхом внутрішньовенної інфузії. Час інфузування може досягати 72 годин, більш переважно від 1 до 24 годин, найбільш переважно або приблизно 1 година, або приблизно 3 години. Особливо переважними є короткі часи інфузування, які дозволяють здійснювати терапевтичний вплив без необхідності перебування хворого в госпіталі протягом нічного часу. Однак у разі необхідності інфузія може приблизно продовжуватися протягом 24 годин і навіть довше.

Робиться циклічне введення, в переважному способі введення пацієнтам проводять внутрішньовенну інфузію сполук згідно з винаходом в перший тиждень кожного циклу, потім в інший час в рамках циклу пацієнтам дають час для відновлення. Переважна тривалість кожного циклу складає або 1, або 3, або 4 тижні; у разі необхідності можуть застосовуватися множинні цикли. У альтернативному протоколі дозування сполуки згідно з винаходом вводять, наприклад, приблизно протягом 1 години протягом 5 днів підряд протягом 3 тижнів. Як варіанти можуть бути прописані й інші схеми.

У випадку необхідності вдаються до відстрочення дози або зниження доз і зміни схеми введення, в залежності від толерантності індивідуального пацієнта до лікування, зокрема, зниження доз рекомендується хворим, у яких рівні трансаміназ або лужної фосфатази в сироватці вищі за норму.

У одному з аспектів даного винаходу забезпечується спосіб лікування людини, ураженої злоякісною пухлиною, що включає в себе введення вказаному хворому сполуки згідно з винаходом в дозі нижче за 1200мкг/м²/день, переважно нижче за 930мкг/м²/день, а більш переважно нижче за 800мкг/м²/день. Відповідною дозою є щонайменше 320мкг/м²/день. Переважною є доза в інтервалі від 400 до 900мкг/м²/день, переважно від 500 до 800мкг/м²/день, більш переважно від 600 до 750мкг/м²/день. Особливо переважними є дози приблизно від 650 до 700мкг/м²/день.

У наступному аспекті даного винаходу пропонується спосіб лікування людини, ураженої злоякісною пухлиною, що включає в себе введення вказаному хворому сполуки згідно з винаходом щодня протягом 5 днів в дозі нижче 930мкг/м²/день, після чого слідує період відновлення, що складає від 1 до 4 тижнів, протягом якого сполуки кахалаліду хворому не вводять. Доза переважно становить 650-750мкг/м²/день, більш переважно - приблизно 700мкг/м²/день. Час інфузії переважно складає між 1 і 24 годинами, більш переважно - між 1 і 3 годинами. Особливо переважним є час інфузії, що становить приблизно 1 годину або приблизно 3 години. Період, що залишається, переважно становить 2-3 тижні, більш переважно - приблизно 2 тижні.

Даний винахід також забезпечує спосіб лікування людини, ураженої злоякісною пухлиною, що включає в себе введення вказаному хворому сполуки згідно з винаходом щотижня в дозі нижче 800мкг/м²/день. Доза переважно становить 600-700мкг/м²/день, більш переважно - 650мкг/м²/день. Час інфузії переважно складає від 1 до 24 годин, більш переважно - від 1 до 3 годин. Особливо переважним є час інфузії, що становить приблизно 1 годину.

Незважаючи на наведене вище орієнтовне дозування, точна підбірка дозування сполуки буде варіювати в залежності від конкретної композиції, способу введення і з урахуванням конкретної ситуації, пов'язаної з станом самого хворого і пухлини, які зазнають лікування. Повинні братися до уваги і інші чинники, такі як вік, вага тіла, стать, дієта, час введення, швидкість виведення, стан хворого, комбінація лікарських засобів, реакція чутливості і тяжкість захворювання. Введення може здійснюватись в безперервному режимі або ж періодично, в рамках максимально переносимої дози.

Даний винахід особливо направлений на лікування пацієнтів, уражених злоякісною пухлиною переміхурової залози, злоякісною пухлиною молочної залози, гепатоцелюлярною карциномою, меланомою, злоякісною пухлиною прямої кишки, злоякісною пухлиною нирки, злоякісною пухлиною яєчника, карциномою легень NSCL, злоякісною пухлиною епітелію, злоякісною пухлиною підшлункової залози, пухлинами, які в надлишку експресують онкоген Her2/neu. У найбільш переважному варіанті воно направлене на лікування гепатоцелюлярної злоякісної пухлини, меланоми, злоякісної пухлини молочної залози і злоякісної пухлини передміхурової залози.

Даний винахід також відноситься до способу лікування шкірного захворювання, що включає в себе гіперпроліферацію дермальних клітин у свавців, де вказаний спосіб включає в себе введення вказаному свавцеві ефективної, нетоксичної кількості сполуки згідно з винаходом. Переважно, якщо шкірним захворюванням є псоріаз. Даний винахід переважно направлений на лікування хворої людини, ураженої псоріазом, особливо, тяжкою формою псоріазу.

Сполуки і композиції згідно з винаходом можуть бути використані і в поєднанні з іншими лікарськими засобами для забезпечення комбінованої терапії. Вказані інші лікарські засоби можуть становити частину однієї і тієї ж композиції або ж можуть бути представлені у вигляді окремої композиції для одночасного введення або ж роздільного введення в різний час. Тотожність іншого лікарського засобу не є особливо лімітованою, хоч комбінації з іншими хіміотерапевтичними, гормональними засобами і антитілами повинні враховуватися.

Кількості сполуки згідно з винаходом і іншого фармацевтично активного агента або агентів і відносні часи введення повинні бути відпрацьовані з метою досягнення бажаного ефекту комбінованої терапії.

Приклади

Приклад 1: отримання (4S)-метилгексанового KF

Основні процедури і початкові стадії процесу відповідають таким, описаним в [міжнародній заявці WO 0158934].

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-Trt Cl-полімерна смола:

Fmoc-групу видаляли, і до вказаного вище пептидил-полімеру послідовно додавали Fmoc-Val-OH (678мг, 2ммоль, 4еквів.), Fmoc-Thr(tBu)-BIN (992мг, 2,5ммоль, 5еквів.), Fmoc-D-Val-OH (678мг, 2ммоль, 4еквів.) і (4S)-MeHex-OH (195мг, 1,5ммоль, 3еквів.) (приклад 3) з використанням DIPCDI (233мкл на 1,5ммоль і 3еквів.; 310мкл на 2ммоль і 4еквів.; і 388мкл на 2,5ммоль, 5еквів.) і HOBt (230мг на 1,5ммоль і 3еквів.; 307мг на 2ммоль і 4еквів.; і 395мг, 2,5ммоль, 5еквів.) протягом 90хв. У всіх випадках через 90хв. зв'язування нінгідриновий тест був негативним. Видалення Fmoc-групи і промивання проводили, як описано в розділі General Procedures.

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-полімерна смола:

Alloc-групу видаляли за допомогою Pd(PPh₃)₄ (58мг, 0,05ммоль, 0,1еквів.) в присутності PhSiH₃ (617мкл, 5ммоль, 10еквів.) в атмосфері Ar, а Alloc-Phe-Z-Dhb-OH (666мг, 2ммоль, 4еквів.) і HOAt (273мг, 2ммоль, 4еквів.) розчиняли в DMF (1,25мл) і додавали до пептидил-полімерної смоли, потім додавали DIPCDI (310мкл, 2ммоль, 4еквів.), і суміш перемішували протягом 5 годин, коли нінгідриновий тест був негативним.

Після промивання з використанням DMF і CH₂Cl₂ аліквоту пептидил-полімерної смоли обробляли сумішшю ТФО-Н₂O (1:99) протягом 1хв, і отриманий продукт охарактеризовували з використанням методу MALDI-TOF-MS, розраховуючи для C₈₈H₁₄₆N₁₄O₂₁, 1736,18. Отримано: m/z 1758,67 [M+NA]⁺, 1774,62 1618,2 [M+K]⁺.

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-OH:

Після промивання з використанням DMF і CH₂Cl₂, Alloc-групу видаляли за допомогою Pd(PPh₃)₄ (58мг, 0,05ммоль, 0,1еквів.) в присутності PhSiH₃ (617мкл, 5ммоль, 10еквів.) в атмосфері Ar. Захищений пептид відщеплювали від полімерної смоли за допомогою суміші ТФО-CH₂Cl₂ (1:99) (5×30сек). Фільтрат збирали на H₂O

(4мл), і H₂O частково видаляли на роторному випарнику. Потім додавали ACN для розчинення твердої речовини, що утворилася в процесі видалення H₂O, і розчин ліофілізували, отримуючи 639мг (387мкмоль, вихід 77%) вказаної в заголовку сполуки із ступенем чистоти >95%, що підтверджено методом HPLC (Кондиція A, t_R 10,5хв).

(4S)-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-цикло(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)=(4S)м етилгексановий KF

Захищений пептид (приклад 6) (639мг, 387мкмоль) розчиняли в CH₂Cl₂ (390мл, 1мМ), і HOBt (237мг, 1,55ммоль) розчиняли в мінімальному об'ємі DMF для розчинення HOBt, додавали DIEA (203мкл, 1,16ммоль, 3еквів.) і DIPCDI (240мкл, 1,55ммоль, еквів.). Суміш залишали на мішалці протягом 1 години, потім результат виконання стадії циклізації контролювали методом HPLC. Розчинник видаляли шляхом випаровування в умовах зниженого тиску. Захищений циклічний пептид розчиняли в суміші ТФО-Н₂O (19:1, 85мл), і суміш, що

утворилася залишали на мішалці протягом 1 години. Розчинник видаляли шляхом випаровування в умовах зниженого тиску, і додавали діоксан (30мл), і розчинник видаляли шляхом випаровування в умовах зниженого тиску (цей процес повторювали тричі), потім додавали H₂O (40мл), і здійснювали ліофілізацію. Грубий продукт очищали методом HPLC (Kromasil C₈ 5мкм, 205×50мм), ізократично 44% ацетонітрилу (+0,05% ТФО) у воді (+0,05% ТФО), 55мл/годину, детектували при 220нм, отримуючи вказаний в заголовку продукт (192мг, 0,13ммоль, вихід 26%, 92,3%). MALDI-TOF-MS, розраховуючи для C₇₅H₁₂₄N₁₄O₁₆, 1477,9.

Отримано: m/z 1500,12 [M+Na]⁺, 1515,97 [M+K]⁺.

Спектр ¹H-ЯМР (2,5мМ; 500МГц, H₂O-D₂O (9:1) цієї сполуки вказаний в таблиці I).

Таблиця І

ЗАЛИШОК	N-H	Но	H β	РЕШТА
(Z)-Dhb	9,59 (с)	-	6,63 (ка, J=7,5 Гц)	1,19 (д, γ -CH ₂)
D-allo-Ile 1	8,82 (д, J=9,0 Гц)	4,42	1,87	1,25, 1,09, 0,82 (γ -CH ₂ , γ - CH ₃ , δ -CH ₃)
L-Phe	8,75 (д, J=5,5 Гц)	4,63	3,08 (м)	7,31 (2H α -H, π) 7,25 (3H α -H, д)
D-allo-Thr	8,67 (д, J=9,0 Гц)	4,64	5,05 (м)	1,21 (γ -CH ₂)
D-Val 3	8,13 (д, J=7,5 Гц)	4,33	2,01	0,90 (2 γ -CH ₂)
L-Orn	8,29 (д, J=7,5 Гц)	4,33	1,66 (2H)	1,88 (γ -CH ₂), 2,96 (ум.с., δ - CH ₂), 7,56 (ϵ - NH ₃ ⁺)
D-allo-Ile 2	7,92 (д)	4,18	1,80	1,25, 1,09, 0,81 (γ -CH ₂ , γ - CH ₃ , δ -CH ₃)
D-Val 5	8,01 (д)	4,08	2,07	0,87 (2 γ -CH ₂)
L-Thr	8,19 (д, J=7,5 Гц)	4,29	4,14 (м)	1,13 (γ -CH ₂)
D-Val 2	7,89 (д, J=7,5 Гц)	4,32	2,11	0,78 (γ -CH ₂)
L-Val 4	8,04 (д)	4,10	2,07	0,90 (2 γ -CH ₂)
L-Val 1	7,19 (д, J=9 Гц)	4,02	1,52	0,75 (γ -CH ₂), 0,65 (д, γ -CH ₃)
D-Pro	-	4,36	2,23, 1,99 (м, β -CH ₂), 1,85 (м, γ -CH ₂), 3,83 (1H, м, δ - CH ₂), 3,64 (1H, м, δ -CH ₂)	
4(S)-MexHex	-	2,26 (2H)	1,57 (β -CH ₂), 1,26, 1,10, 1,93, 0,79 (α -CH ₂ , δ -CH ₃ , γ - CH, π -CH ₃)	

¹H-ЯМР-спектроскопію [1H, NOESY, TOCSY при (278K)] проводили на установці Varian Unity Plus (500МГц). Хімічні зсуви (d) виражені в частинах на мільйон у бік зменшення відносно тетраметилсилану (TMS). Константи зв'язування виражені в Герцах.

Приклад 2: отримання (4R)-метилгексанового KF

Експериментальні процедури проводилися, як в прикладі 1, починаючи з 1г полімерної смоли, з єдиним виключенням, що на відповідній стадії (4S)-MexHex був замінений на (4R)-MexHex. Отриманий продукт (220мг, 0,15ммоль, 30%, 92,3% чистоти) був охарактеризований за допомогою ES-MS, C₇₅H₁₂₄N₁₄O₁₆, 1477,9. Отримано: m/z 1499,07 [M+Na]⁺, 1514,94 [M+K]⁺.

Приклад 3: Цитотоксична активність in vitro

Метою даних досліджень є припинення росту культури пухлинних клітин "in vitro" шляхом безперервного контакту цих клітин із зразком, що тестується.

КЛІТИННІ ЛІНІЇ

Назва	№ ATCC	Вид	Тканина	Характеристики
P-388	CCL-46	миша	асцитна рідина	лімфоїдна неоплазма
K-562	CCL-243	людина	лейкемія	еритролейкемія (плевральна ефузія)
A-549	CCL-185	людина	легеня	карцинома легень "NSCL"
SK-MEL-28	HTB-72	людина	меланома	злоякісна меланома
HT-29	HTB-38	людина	товста кишка	аденокарцинома товстої кишки
LoVo	CCL-229	людина	товста кишка	аденокарцинома товстої кишки
LoVo-Dox		людина	товста кишка	аденокарцинома товстої кишки (MDR)
SW620	CCL-228	людина	товста кишка	аденокарцинома товстої кишки (метастази в лімфовузлі)
DU-145	HTB-81	людина	простата	карцинома простати без андрогенних рецепторів
LNCaP	CRL-1740	людина	простата	аденокарцинома простати з андрогенними рецепторами
SK-BR-3	HTB-30	людина	молочна залоза	аденокарцинома молочної залози, Her2/ncu+, (плевральна

5	MCF-7	HTB-22	людина	молочна залоза	аденокарцинома молочної залози, (плевральна ефузія)
	MDA-MB-231	HTB-26	людина	молочна залоза	аденокарцинома молочної залози Her2/непт., (плевральна ефузія)
10	IGROV-1		людина	яєчник	аденокарцинома яєчника
	IGROV-ET		людина	яєчник	аденокарцинома яєчника, що характеризується ET- 743-резистентними клітинами
15	SK-OV-3	HTB-77	людина	яєчник	аденокарцинома яєчника (злоякісна асцит)
20	OVCAR-3	HTB-161	людина	яєчник	аденокарцинома яєчника
	HeLa	CCL-2	людина	шийка матки	епітеліоїдна карцинома шийки матки
25	HeLa-APL	CCL-3	людина	шийка матки	епітеліоїдна карцинома шийки матки, що характеризується аплідин- резистентними клітинами
30	A-498	HTB-44	людина	нирка	карцинома нирки
	PANC-1	CRL-1469	людина	підшлункова залоза	епітеліоїдна карцинома підшлункової залози
35	HMEC 1		людина	ендотелій	

Різновид колориметричного аналізу з використанням реакції сульфородаміну В (SRB) був адаптований для кількісного вимірювання росту клітин та їх життєздатності [відповідно до технології, описаної Philip Skehan, et al. (1990), New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, J. Natl. Cancer Inst., 82: 1107-1112].

У цьому способі аналізу використовують 96-ямкові культуральні мікропланшети діаметром 9мм (Faircloth, 1988; Mosmann, 1983). Більшість клітинних ліній отримана з Американської Колекції Типових Культур (ATCC), утвореної з різних типів ракових клітин людини.

Клітини підтримували в культуральному середовищі RPMI 1640, 10% PBS, збагаченому 0,1г/л пеніциліну і 0,1г/л стрептоміцинсульфату, а потім інкубували при 37°C в атмосфері 5% CO₂ і 98% вологості. Для проведення експериментів клітини збирали з субконфлюентних культур за допомогою трипсину і перед посівом ресуспендували їх в свіжому середовищі.

Клітини висівали в 96-ямкові культуральні мікропланшети, по 5×10^3 клітин на ямку, в аліквоти з 195мкл середовища, і залишали їх, даючи їм прикріпитися до поверхні планшета в умовах росту в культуральному середовищі, що не містить лікарського засобу, протягом 18 годин. Потім додавали зразки [випробовуваної сполуки] в аліквотах по 5мкл в кількостях, що варіювали від 10 до 10^{-8} мкг/мл, розчинених в DMSO/ЕtOH/PBS (0,5:0,5:99). Після 48-годинної експозиції протипухлинний ефект вимірювали, використовуючи метод SRB: клітини фіксували шляхом додавання 50мкл холодної 50% (вага/об'єм) трихлороцтової кислоти (ТХО) і інкубували протягом 60 хвилин при 4°C. Планшети промивали деіонізованою водою і сушили. Сто мікролітрів розчину SRB (0,4% вага/об'єм в 1% оцтовій кислоті) додавали в кожну ямку мікропланшета і інкубували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Незв'язаний SRB видаляли шляхом промивання 1% оцтовою кислотою. Планшети сушили на повітрі, і зв'язаний барвник солюбілізували Трис-буфером. Оптичні густини зчитували на автоматичному спектрофотометричному пристрої для зчитування планшетів при одній довжині хвилі в 490нм.

На основі даних, отриманих в трьох паралельній ямках, обчислювали величини середніх значень $\pm$ SD. Були обчислені деякі параметри, що характеризують відповіді клітин: GI=інгібування росту, TGI=загальне інгібування росту (цитостатичний ефект) і LC=клітинна загибель (цитотоксичний ефект).

Результати приведені в таблиці II, істотних відмінностей між наведеними сполуками не відмічається:

Таблица II

Дани по активності (молярній)

Лінійні клітини		5-метилгекс. KF	(4S)-метилгекс. KF	(4R)-метилгекс. KF
DU-145	GI50	7,51E-07	2,37E-07	1,20E-06
	TGI	1,64E-06	6,97E-07	2,14E-06
	LC50	3,60E-06	2,49E-06	3,62E-06
LN-cap	GI50	9,61E-07	1,12E-06	1,50E-06
	TGI	2,31E-06	2,58E-06	2,46E-06
	LC50	5,57E-06	5,93E-06	4,04E-06
SKOV-3	GI50	-	-	-
	TGI	-	-	-
	LC50	-	-	-
IGROV	GI50	4,20E-07	2,92E-07	9,41E-07
	TGI	1,40E-06	7,51E-07	1,81E-06
	LC50	3,80E-06	2,62E-06	3,50E-06
IGROV-ET	GI50	4,47E-07	2,25E-07	8,05E-07
	TGI	9,54E-07	4,79E-07	1,62E-06
	LC50	3,09E-06	2,82E-06	3,26E-06
SK-BR-3	GI50	3,98E-07	1,81E-07	1,25E-06
	TGI	4,48E-06	3,32E-07	2,20E-06
	LC50	6,77E-06	6,06E-07	3,66E-06
MEL-28	GI50	6,90E-07	1,43E-06	1,14E-06
	TGI	1,56E-06	2,60E-06	2,09E-06
	LC50	3,55E-06	4,72E-06	3,80E-06
H-MEC-1	GI50	-	-	-
	TGI	-	-	-
	LC50	-	-	-
A-549	GI50	8,66E-07	2,67E-07	1,20E-06
	TGI	1,81E-06	7,17E-07	2,26E-06
	LC50	3,78E-06	3,09E-06	4,24E-06
K-562	GI50	1,54E-06	2,52E-06	3,73E-06
	TGI	2,95E-06	6,77E-06	6,77E-06
	LC50	5,66E-06	6,77E-06	6,77E-06

5	PANC-1	GI50	1,38E-06	6,77E-06	4,70E-06
		TGI	2,89E-06	6,77E-06	4,24E-06
		LC50	6,07E-06	6,77E-06	4,24E-06
10	HT-29	GI50	1,41E-07	3,01E-07	7,38E-07
		TGI	2,81E-07	7,51E-07	1,54E-06
		LC50	5,62E-07	2,71E-06	3,22E-06
15	LOVO	GI50	1,20E-07	1,63E-07	2,48E-07
		TGI	2,26E-07	3,08E-07	7,78E-07
		LC50	4,28E-07	5,80E-07	2,28E-06
20	LOVO-DOX	GI50	1,62E-07	1,57E-07	2,88E-07
		TGI	3,17E-07	3,25E-07	7,71E-07
		LC50	6,20E-07	6,77E-07	2,19E-06
25	HELA	GI50	8,39E-07	1,18E-06	1,05E-06
		TGI	1,89E-06	2,42E-06	1,93E-06
		LC50	4,26E-06	4,97E-06	3,55E-06
30	HELA-AFL	GI50	1,06E-06	1,04E-06	1,56E-06
		TGI	2,17E-06	2,13E-06	3,47E-06
		LC50	4,43E-06	4,39E-06	6,77E-06

Приклад 4: токсичність in vitro

З метою встановлення цитотоксичності вказаних лікарських засобів відносно нормальних клітин використовували 96-ямкові планшети, засіяні з щільністю по 5000 клітин на ямку клітинами нормальних клітинних ліній, встановлених відповідно до вказівок ATCC: AML-12, нормальні клітини печінки миші, і NRK-52E, нормальні клітини нирки щура. Після висівання клітин в кожному планшеті їх витримували протягом ночі перед додаванням лікарського засобу, що тестується. До кожної ямки (100мкл середовища) додавали 10мкл лікарського засобу в середовищі в різних концентраціях (в кінцевій концентрації 1×10^{-10} -0,01мг/мл), а потім інкубували протягом

ночі при 37°C в присутності 5% CO₂. Всі експерименти повторювали щонайменше 3 рази, причому в кожному експерименті використовували по дві паралельні проби. Через 24 години здійснювали аналіз MTS (водний CellTiter 96), відповідно до інструкцій виробника (PROMEGA) (для всіх типів клітин). Життєздатність клітин (мітохондріальну активність) визначали шляхом ферментативного перетворення формазанового субстрату.

Як видно з результатів, наведених в таблиці III, істотних відмінностей між сполуками 5-метилгексанового

KF і (4S)-метилгексанового KF не спостерігається.

Таблиця III		
	Печінка ALM IC ₅₀ (мкМ)	Нирка NRKIC ₅₀ (мкМ)
5-метилгексановий KF	3,4	2,7
(4S)-метилгексановий KF	5,4	2,7

Приклад 5: МПД in vivo у миші CD-1 і у безтимусних тварин

Максимально переносиму дозу визначали у мишей CD-1 і у безтимусних мишей (обох статей) для кожного лікарського засобу після однократного введення болюсу і після 5 щоденних введеннь дози. Результати наведені в таблиці IV, де істотних відмінностей між сполуками 5-метилгексанового KF і (4S)-метилгексанового KF не спостерігається.

Таблиця IV		
	5-метилгексановий KF	(4S)-метилгексановий KF
Самці мишей CD-1 Болюс МПД	300	300
Самиці мишей CD-1 Болюс МПД	200	200
Самці мишей CD-1 5DD МПД	175-350	175-350
Самиці мишей CD-1 5DD МПД	175-350	175-350
Самці безтимусних мишей Болюс МПД	350	350
Самиці безтимусних мишей Болюс МПД	325	325
Самці безтимусних мишей 5DD МПД	350	350
Самиці безтимусних мишей 5DD МПД	325	325

Приклад 6: ефективність in vivo при ксенотрансплантації молочної залози (5DD)

Ефективність 5-метилгексанового KF і (4S)-метилгексанового KF, кожен з яких вводили в кількості трьох чвертей від максимально переносимей дози (МПД), вивчали у безтимусних самиць мишей, яким після

ксенотрансплантації молочної залози внутрішньовенно (в/в) вводили протягом п'яти днів підряд (тобто в режимі QD ×5) болюсні ін'єкції (дні 0-4). Сполуки застосовували у вигляді свіжоприготовлених запаяних в ампули розчинів в складі з носієм [кремофор-EL/етанол/вода (5:5:90)]. Кожну добову дозу (в режимі QD×5) вводили внутрішньовенно в об'ємі 0,2мл розчину для ін'єкцій на 20 грамів ваги тварини.

Оцінка власне розміру пухлини в групах, оброблених відповідним чином, відносно контрольної групи, якій вводили носій (тобто % $\Delta T/\Delta C$), показала, що найнижче (оптимальне) значення досягалось на день 3 після початку введення лікарського засобу у всіх групах. Крім того, за допомогою попарного статистичного аналізу (з використанням непараметричного методу Mann-Whitney) вдалося з'ясувати, що існує значна різниця в ефективності між двома вказаними сполуками, що є досить несподіваним з тієї точки зору, що ці сполуки мають дуже подібну структуру, а також в світлі результатів, наведених в попередніх прикладах.

На основі описаних тут досліджень ефективності і проведених раніше експериментів на токсичність (приклад 4) терапевтичний показник щонайменше 1,33 ($1 \times \text{МПД}/0,75 \times \text{МПД}$, доза, при якій лікарський засіб є токсичним/дозу, при якій лікарський засіб є ефективним) може бути затверджений для сполуки (4S)-метилгексановий KF. Крім того, ще одним пов'язаним з цим біологічним результатом виявилось те, що протипухлинний ефект (4S)-метилгексанового KF відносно молочної залози був більш тривалим, ніж відносно трансплантатів передміхурової залози (приклад 7), при одній і тій самій відносній дозі МПД. Резюмуючи, можна стверджувати, що (4S)-метилгексановий KF безперечно є більш потужним ізомером відносно трансплантатів молочної залози, а тривалість його біологічної дії дає підстави вважати, що він має більш тривалий вплив на пухлини такого типу.

Таблиця V			
	Доза (мкг/кг)	Власне розмір пухлини, мм ³ , n=9	% $\Delta T/\Delta C$
Контроль		167	100
5-метилгексановий KF	245	108	65
(4S)-метилгексановий KF	245	74	44

Приклад 7: ефективність in vivo при ксенотрансплантації передміхурової залози (5DD)

Ефективність однакової дози кожного з 5-метилгексанового KF і (4S)-метилгексанового KF вивчали у безтимусних самців мишей, яким після ксенотрансплантації передміхурової залози внутрішньовенно (в/в) вводили протягом п'яти днів підряд (тобто в режимі QD ×5) болюсні ін'єкції (дні 0-4). Сполуки застосовували у вигляді свіжоприготовлених запаяних в ампули розчинів в складі з носієм [кремофор-EL/етанол/вода (5:5:90)]. Кожну добову дозу (в режимі QD×5) вводили внутрішньовенно в об'ємі 0,2мл розчину для ін'єкцій на 20 грамів ваги тварини.

Оцінка власне розміру пухлини в групах, оброблених відповідним чином, відносно контрольної групи, якій вводили носій (тобто % $\Delta T/\Delta C$), показала, що найнижче (оптимальне) значення досягалось на день 3 після початку введення лікарського засобу у всіх групах. Крім того, за допомогою попарного статистичного аналізу (з використанням непараметричного методу Mann-Whitney) вдалося з'ясувати, що істотно більша ефективність досягалася з допомогою (4S)-метилгексанового KF в дозі 262мкг/кг/день. На основі описаних тут досліджень ефективності і проведених раніше експериментів на токсичність (приклад 4) терапевтичний показник щонайменше 1,33 ($1 \times \text{МПД}/0,75 \times \text{МПД}$, доза, при якій лікарський засіб є токсичним/дозу, при якій лікарський засіб є ефективним) може бути затверджений для сполуки (4S)-метилгексановий KF. Результати наведені нижче в таблиці VI.

Таблиця VI			
	Доза (мкг/кг)	Власне розмір пухлини, мм ³ , n=10	% $\Delta T/\Delta C$
Контроль	-	236	100
5-метилгексановий KF	262	126	53
(4S)-метилгексановий KF	262	62	26

Приклад 8: протипухлинна активність аналогів кахалаліду F, що досліджується на порожнистих волокнах з використанням панелі ліній пухлинних клітин людини

Протипухлинна активність аналогів кахалаліду F, що обговорювалась вище, була перевірена на системі порожнистих волокон (HF) за допомогою панелі ліній пухлинних клітин людини, а саме клітин SK-Hep-1 (гепатоми), HepG2 (гепатоклітинної карциноми), Рапс-1 (підшлункової залози) і Mel-28 (меланоми). Пухлинні клітини людини були інкапсульовані в порожнисті волокна in vitro, а потім імплантовані безтимусним мишам-самцям in vivo.

Дози 5-метилгексанового KF і (4S)-метилгексанового KF підбирали на основі попередніх МПД-експериментів, проведених на безтимусних мишах, внаслідок яких було вибране дозування 325мкг/кг/день (див. приклад 5). П'ять днів підряд дозу вводили внутрішньочеревинно (в/о) в об'ємі 0,2мл розчину для ін'єкцій на 20 грамів ваги тварини.

Загалом сполука KF-4(S)-Met проявляє статистично значущу протипухлинну активність проти клітин гепатоми (підшкірно, п/ш), гепатоклітинної карциноми (як підшкірно, так і внутрішньочеревинно), підшлункової залози (внутрішньочеревинно) і виявляє тенденцію у бік значущості ефекту (тобто P=0,059) при підшкірному введенні при пухлині підшлункової залози і меланомі. На відміну від цієї сполуки, KF-5-Met активний відносно меншої кількості типів пухлин, а саме тільки відносно пухлин підшлункової залози (як підшкірно, так і

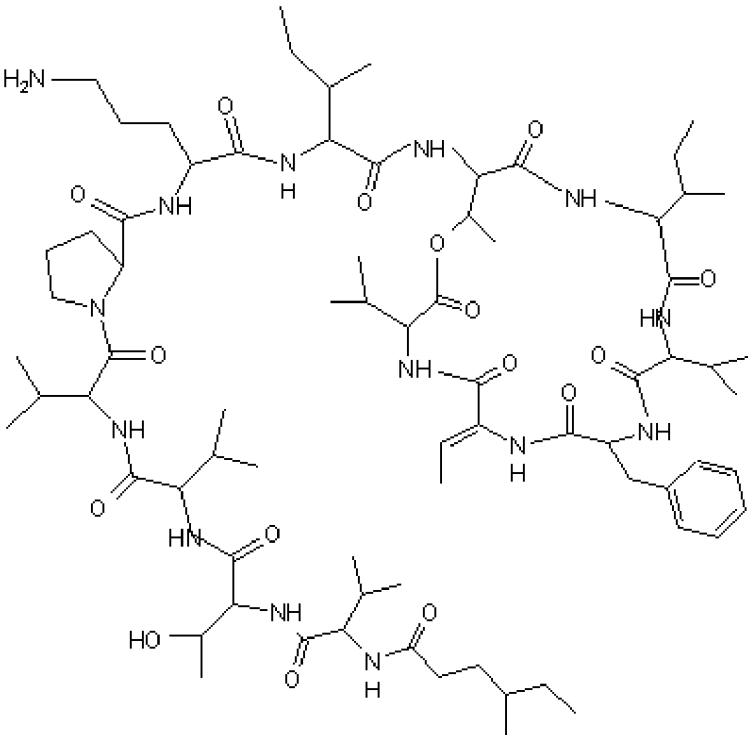
внутрішньочеревинно) і меланоми (підшкірно), але не відносно всіх типів раку печінки, які були протестовані. Нижче в таблиці наведені сумарні результати, які ясно показують відмінності між цими сполуками.

Лікарський засіб	Тип пухлини/НР-локалізація (довільна кількість клітин/НР)							
	SK-Hep-1		HepG2		Panc-1		Me1-28	
	в/о	п/ш	в/о	п/шо	в/о	п/ш	в/о	п/ш
Носій	0,575	0,872	0,576	0,509	0,200	0,392	2,078	1,77
KF-4(S)-Met	0,485	0,525*	0,335*	0,319*	0,129*	0,237§	1,906	1,51
KF-5-Met	0,693	0,686	0,475	0,361	0,149*	0,192*	1,771	1,56
*Статистично знануше, P<0,05.								
§Тенденція до значущості, тобто P=0,059.								

Формула винаходу

1. Сполука формули I

Формула I



- і її фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри та солі складних ефірів, таутмери і сольвати.
2. Сполука за п. 1, яка являє собою (4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-*allo*-Ile-цикло(D-*allo*-Thr-D-*allo*-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val) і її фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри та солі складних ефірів, таутмери і сольвати.
3. Сполука за п. 1, яка являє собою (4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-*allo*-Ile-цикло(D-*allo*-Thr-D-*allo*-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val) і її фармацевтично прийнятні солі.
4. Сполука за будь-яким з пунктів 1-3, яка містить щонайбільше 25 % будь-якого іншого кахалаліду.
5. Сполука за будь-яким з пунктів 1-3, яка містить щонайбільше 10 % будь-якого іншого кахалаліду.
6. Сполука за будь-яким з пунктів 1-3, яка містить щонайбільше 5 % будь-якого іншого кахалаліду.
7. Сполука за будь-яким з пунктів 1-3, яка містить щонайбільше 2 % будь-якого іншого кахалаліду.
8. Сполука за будь-яким з пунктів 1-3, яка містить щонайбільше 1 % будь-якого іншого кахалаліду.
9. Сполука за будь-яким з пунктів 1-3, яка містить щонайбільше 0,5 % будь-якого іншого кахалаліду.
10. Сполука за будь-яким з пунктів 1-3, яка містить менше ніж 0,5 % будь-якого іншого кахалаліду.
11. Сполука за будь-яким з пунктів 4-10, де іншим кахалалідом є кахалалід F, який має 5-метилгексильний бічний ланцюг.
12. Сполука, визначена в будь-якому з пунктів 1-3, яка є сполукою, по суті, в чистому вигляді.
13. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку, визначену у будь-якому з пунктів 1-12, і фармацевтично прийнятний носій, наповнювач або розріджувач.
14. Спосіб лікування будь-якого ссавця, переважно людини, ураженого злоякісною пухлиною, який включає в себе введення ураженому індивіду терапевтично ефективної кількості сполуки, визначеної у будь-якому з пунктів 1-12.

15. Спосіб за пунктом 14, де ссавцем є людина.

16. Спосіб за пунктом 15, де пацієнт уражений стійкою формою злоякісної пухлини, яка не дає сприятливої відповіді на інші види терапії.

17. Спосіб за пунктом 15, де злоякісна пухлина вибрана із злоякісної пухлини передміхурової залози, злоякісної пухлини молочної залози, гепатоклітинної карциноми, меланоми, злоякісної пухлини прямої кишки, злоякісної пухлини нирки, злоякісної пухлини яєчника, карциноми легень NSCL, злоякісної пухлини епітелію, злоякісної пухлини підшлункової залози і пухлин, які експресують в підвищеній кількості онкоген Her2/neu.

18. Застосування сполуки, визначеної у будь-якому з пунктів 1-12, у виробництві лікарського засобу.

19. Застосування сполуки, визначеної у будь-якому з пунктів 1-12, у виробництві лікарського засобу для лікування злоякісної пухлини.

20. Набір, що включає в себе окремі контейнери, які містять фармацевтичну композицію, що включає в себе сполуку, визначену у будь-якому з пунктів 1-12, і відновлювальний агент.

21. Спосіб одержання сполуки, визначеної у будь-якому з пунктів 1-3, твердофазним синтезом, де як вихідну сполуку використовують 4-метилгексанову кислоту або (4S)-метилгексанову кислоту.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2007, N 19, 26.11.2007. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

U A 8 0 9 9 2 C 2

U A 8 0 9 9 2 C 2