



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86399

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/185

A61P 35/00

A61P 17/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ЗАСТОСУВАННЯ 2,5-ДИГІДРОКСИБЕНЗОЛСУЛЬФОНОВОЇ КИСЛОТИ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІКІВ,  
ЯКІ ЗАСТОСОВУЮТЬ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ХВОРОБ, ЗАЛЕЖНИХ ВІД АНГІОГЕНЕЗУ

1

(21) a200609127

(22) 16.02.2005

(24) 27.04.2009

(86) PCT/ES2005/070017, 16.02.2005

(31) P200400371

(32) 17.02.2004

(33) ES

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) КУЕВАС САНЧЕС ПЕДРО, ES/ES, РОМЕРО  
ГАРРІДО АНТОНІО, ES/ES, ЛОСАНО ПУЕРТО  
РОСА МАРІЯ, ES/ES, ПІМЕНЕС ГАЛЛЕГО ПІЛЛЕ-  
РМО, ES/ES, ВАЛВЕРДЕ ЛОПЕС СЕРАФІН, ES/ES  
(73) АКСЬЙОН МЕДІСІНЕС, С.Л.(56) NOUR A.F. ET AL: 'Preliminary clinical study with  
calcium dobesilate in fibrocystic disease of the breast,  
a pilot study.' INVASIVE TREATMENT. vol. 12, no. 3,  
1986, pages 233 - 242RUIZ E. ET AL: 'Calcium dobesilate increases  
endothelium-dependent relaxation in endothelium-  
injured rabbit aorta.', XP003001467 Retrieved from  
stn Database accession no. (1999:6013) &  
PHARMACOLOGICAL RESEARCH. vol. 38, no. 5,  
1998, pages 361 - 366(57) 1. Застосування 2,5-  
дигідроксибензолсульфонові кислоти або будь-  
якої з її фармацевтично прийнятних солей для  
виготовлення ліків, які застосовують для лікування  
хвороб, залежних від ангіогенезу.2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що  
залежна від ангіогенезу хвороба також є пов'язаною  
зі зниженням апоптозу.3. Застосування за будь-яким з пп. 1 або 2, яке  
**відрізняється** тим, що виготовлені ліки призна-  
чаються для застосування у лікуванні від раку.4. Застосування за п. 3, яке **відрізняється** тим, що  
виготовлені ліки застосовуються для збільшення  
антипроліферативного впливу цитостатичних ліків  
у лікуванні від раку.5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке **відріз-  
няється** тим, що сіль, якій віддають перевагу для  
виготовлення ліків, є калієвою сіллю 2,5-  
дигідроксибензолсульфонові кислоти.6. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке **відріз-  
няється** тим, що сіль, якій віддають перевагу для

2

виготовлення ліків, є кальцієвою сіллю 2,5-  
дигідроксибензолсульфонові кислоти.7. Застосування за будь-яким з попередніх пп. 1-6,  
яке **відрізняється** тим, що виготовлені ліки також  
включають достатню кількість принаймні одного  
фармацевтично прийнятного ексципієнта.8. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що  
виготовлені ліки призначаються для застосування  
у лікуванні від псоріазу.9. Застосування за п. 8, яке **відрізняється** тим, що  
сіль, якій віддають перевагу для виготовлення  
ліків, є калієвою сіллю 2,5-  
дигідроксибензолсульфонові кислоти.10. Застосування за п. 8, яке **відрізняється** тим,  
що сіль, якій віддають перевагу для виготовлення  
ліків, є кальцієвою сіллю 2,5-  
дигідроксибензолсульфонові кислоти.11. Застосування за будь-яким з попередніх пп. 8-  
10, яке **відрізняється** тим, що виготовлені ліки  
також включають достатню кількість принаймні  
одного фармацевтично прийнятного ексципієнта.12. Застосування за будь-яким з пп. 8-11, яке **від-  
різняється** тим, що ліки є композицією для місце-  
вого застосування.13. Застосування за п. 12, яке **відрізняється** тим,  
що ліки є кремом або маззю, склад якої включає:  
фармацевтично ефективну кількість 2,5-  
дигідроксибензолсульфонові кислоти або будь-  
якої з її фармацевтично прийнятних солей,  
фармацевтично прийнятну кількість принаймні  
одного спирту,  
фармацевтично прийнятну кількість принаймні  
одного емульгатора,  
фармацевтично прийнятну кількість принаймні  
одного ексципієнта,  
фармацевтично прийнятну кількість принаймні  
одного ексципієнта, який включає ліпідну фазу,  
зокрема вазелін,  
дистильовану воду.14. Застосування за п. 13, яке **відрізняється** тим,  
що ліки є кремом або маззю, склад якої включає:  
5% калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові  
кислоти,  
2,5 % цетилового спирту,  
2,5 % стеаринового спирту,

(13) C2

(11) 86399

(19) UA

30 % рідкого вазеліну,  
30 % білого м'якого парафіну,

5 % Span (сорбітолеату),  
q.s 100 г дистильованої води.

Даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка включає 2,5-дигідроксibenзолсульфонову кислоту, та її застосування у приготуванні ліків для лікування хвороб, які характеризуються інтенсивною проліферацією клітин, васкуляризацією (залежних від судин хвороб), точніше, залежних від судин хвороб, які також є пов'язаними зі зниженням апоптозу, яке відбувається, наприклад, у разі раку або псоріазу.

Злоякісні пухлини характеризуються, крім неконтрольованої клітинної проліферації, їхньою здатністю до вторгнення у нормальні навколопухлинні тканини. Інвазія пухлин є складним процесом, який розвивається згідно з такими послідовними етапами: а) прилипання пухлинних клітин до білків позаклітинного матриксу; б) розщеплення білків позаклітинного матриксу протеазами, які створюють позаклітинні проміжки, що використовуються пухлинними клітинами, с) міграція через динамічний і складний механізм, який вимагає синтезу нових частин цитоплазматичної мембрани та реорганізації цитоскелета [Giese A, Westphal M. *Neurosurgery* 1996; 39: 235-252]. У клітин, які з пухлинної маси вторгаються у нормальну навколопухлинну тканину, генетична програма смерті клітин не діє, і тому пухлинні клітини, які мігрують для вторгнення у навколопухлинні інтактні тканини, уникають апоптозу [Mariani I et al. *Clin Cancer Res* 7:2480-2489, 2001]. Коли група пухлинних клітин досягає об'єму від 2 до 3 мм<sup>3</sup>, пухлинні клітини синтезують велику кількість ангіогенних факторів для протидії гіпоксичній ситуації цієї первинної пухлини [Folkman J. *N. Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971; Carmeliet P, Jain RK. *Nature* 407: 249-257, 2000; Yancopoulos GD et al. *Nature* 407: 242-248, 2000], які активізують навколопухлинні кровоносні судини таким чином, що вони утворюють нові кровоносні судини (ангіогенез), які проникають у пухлину для постачання кисню та поживних речовин і видаляють продукти катаболізму пухлини. Такі самі клітинні процеси, які трапляються під час інвазії пухлин (рухливості та відсутності апоптозу), відбуваються відцентрово й під час ангіогенезу пухлин. Таким чином, інгібування інвазивної здатності пухлинних клітин та ендотеліальних клітин має забезпечувати затримку росту пухлин шляхом інгібування поширення пухлини, зниження ангіогенезу та сприяння апоптозові. Таким чином, ефективне лікування від раку має інгібувати міграцію, ангіогенез і збільшувати апоптоз без створення цих ефектів у нормальних клітинах.

Існує багато протипухлинних і протиангіогенних агентів на різних стадіях клінічних розробок в онкології [Brem S. *Cancer Control* 6: 436-458, 1999], серед яких значну кількість складають пептиди, які використовуються організмом для протидії впливу позитивних регуляторів ангіогенезу [Hagerdorn M, Bikfalvi A. *Crit Rev One Hemat* 34: 89-110, 2000]. Однак, якщо ці пептиди порівняти зі сполуками з

значно нижчою молекулярною масою, стають явними їхні незручності з фармакологічної точки зору. З іншого боку, було доведено, що різні синтетичні сполуки, які містять ароматичні кільця в своїй молекулярній структурі й діють як інгібітори мітогенної активності, викликані факторами росту, є цитотоксичними для нерухомих або непухлинних клітин [Lozano RM J. *Mol Bio* 281: 899-9115, 1998]. Таким чином, продовжує існувати потреба у сполуках з протипухлинною, протиангіогенною та проапоптозною активністю з низькою токсичністю для інтактних, нерухомих, непухлинних клітин. Нині існує великий інтерес до пошуку нових терапевтичних показань для старих ліків. У цьому зв'язку нещодавно було доведено, що різні антибіотики, крім їхньої протимікробної активності, мають антипроліферативний вплив, наприклад, як у разі рапаміцину [Morice MC et al. *N Engl J Med* 346: 1773-1780, 2002] або неоміцину [Cuevas P. et al. *Neurol Res* 224: 389-391, 2002]; або застосовуються як транквілізатори, такі як норфлуксацин (фторохінолон) [Johnstone TB et al. *Nat Med* 10; 31-32, 2004].

Псоріаз є ангіозалежною хронічною хворобою, якою уражено 2-3% населення світу і яка характеризується епідермічною гіперплазією, дермально-епідермальною інфільтрацією запальних клітин та Т лімфоцитів і дуже вираженим розвитком васкуляризації, разом зі зниженням відмирання клітин через апоптоз [Kosak M et al. *Int J Dermatol* 42: 789-793, 2003]. На даний час не існує засобу, який дозволяє вилікувати псоріаз. Протипсоріазне лікування може бути місцевим або системним, залежно від поширення та тяжкості хвороби. Найбільш поширений спосіб протипсоріазної місцевої терапії включає застосування різних типів кортикоїдів, але тривале застосування цих сполук є пов'язаним з атрофією шкіри, слідами розтягнень та телеангіектазією [Baker BS, Fry L. *Cutis* 1999; 64: 315-318]. Системна терапія з застосуванням імунодепресантних засобів викликає дуже важкі побічні ефекти [Wolinska V. et al. *Clin Rheumatol* 2001; 20: 406-410]. Наприклад, застосування циклоспорину для лікування від псоріазу може викликати ниркову токсичність (інтерстиціальний фіброз та тубулярну атрофію), гіпертонію, гіпомагніємію, гіперкальціємію та печінкову дисфункцію [Travis L, Weinberg JM. *Drugs of Today* 2002; 38: 847-865]. Постійне застосування іншого імунодепресантного засобу для лікування псоріазу, такролімусу, може викликати гіпертонію, ниркову токсичність та пригнічення імунітету [Jegasothy BV et al. *Arch Dermatol* 1992; 128: 781-785]. Нещодавно було описано, що місцеве нанесення такролімусу прискорює канцерогенез у шкірі мишей [Niwa Y, Terashima T, Sumi H. *B J Dermatol* 2003; 149: 960-967]. Таким чином, існує потреба в нових протипсоріазних сполуках, які виявляють свою ефективність без викликання явних побічних ефектів, таких як ті, що є пов'язані

ними з найпоширенішими протипсоріазними сполуками.

2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота є похідною 2,5-дигідроксибензойної кислоти, яку фармакологічно застосовують у формі різних солей (головним чином, солей кальцію, калію та магнію) і яка забезпечує стійкість. 2,5-дигідроксибензолсульфову кислоту застосовують з 70-х років як пероральний васкулотропний засіб.

2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота інгібує агрегацію тромбоцитів, збільшення проникності капілярів та в'язкості крові у пацієнтів з діабетичною ретинопатією [Bayer J. et al. Dtsch. Mod Wschr 1980; 46: 160-1608; Banarroch I.S. et al. Ophthalmic Res 1985; 17: 131-138; Michal M, Giessinger N. Thromb Res 1988; 51: 593-605]. Про метаболізм та фармакокінетику цієї сполуки в людському організмі відомо з 1974 року [Benakis A. et al. Therapie 1974; 29: 211-219]. Останні експерименти довели, що 2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота підвищує активність ендотеліальної ізоформи синтази оксиду азоту [ендотеліальна синтаза оксиду азоту (eNOS)] в ендотеліальних клітинах щура без створення цитотоксичних ефектів [Suscheck C. et al. Bt J Pharmacol 1997; 122: 1502-1508]. Крім того, 2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота сприяє релаксації артерій статевго члена людини *in vitro* [Angulo J et al. Br J Pharmacol 2003; 139: 854-862]. Існує експериментальне підтвердження того, що 2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота (рецептована у формі солей кальцію або магнію) має антиоксидантну активність *in vitro* [Brunet J et al. Fundam Clin Pharmacol 12:205-212, 1998].

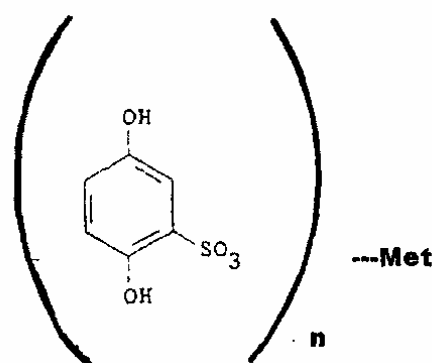
В основі даного винаходу лежить виявлення нових видів активності 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти та/або її солей, пов'язаної з їх антипроліферативною, протиміграційною, протиангіогенною та проапоптозною здатністю у рухомих клітинах, видів активності, які у поєднанні виправдовують застосування цієї сполуки як корисної для лікування залежних від судин хвороб, таких як рак, які характеризуються гіперпроліферацією, вторгненням клітин та надмірним ангіогенезом, разом з недостатнім відмиранням клітин через апоптоз, без викликання токсичності для непухлинних інтактних або нерухомих клітин. В експериментах використовували гліомні пухлинні клітини, оскільки гліоми є дуже інвазивними пухлинами зі значною ангіогенною здатністю та значним дефіцитом апоптозу [Merzak A, Pilkington G.J. Cancer Metastasis Rev 16: 155-177, 1997].

В основі даного винаходу також лежить доведений факт, що 2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота та/або її солі мають, у комбінованій формі, антипроліферативний, протиангіогенний та проапоптозний вплив і, таким чином, було оцінено її терапевтичну ефективність у хронічних псоріатичних бляшках, які характеризуються епідермічною гіперпроліферацією, гострим дермальним ангіогенезом та дефіцитом апоптозу [Karasek MA, Cutis 64: 319-322, 1999].

Таким чином, цей винахід стосується нових способів лікування від раку та інших залежних від судин хвороб і ґрунтується на тому, що 2,5-

дигідроксибензолсульфонова кислота та/або її солі виявили свою здатність до інгібування росту та міграції і викликання апоптозу в пухлинних клітинах *in vitro*, а також здатність до інгібування ангіогенезу *in vivo*, викликаного фактором росту фібробластів (FGF). Таким чином, завдяки поєднанню таких можливостей, вищезгадані сполуки стають корисними для лікування злоякісних пухлин та гематологічних неопластичних хвороб, а також для лікування інших важких пов'язаних з васкуляризацією патологій (залежних від судин хвороб).

2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота, рецептована у формі солі, є комерційним продуктом (наприклад, сіль калію можна придбати у Merck Farma у Quimica SA, Mollet del Valles, Barcelona) з такою молекулярною формулою:



в якій Met = метал, і  $\eta$  є показником валентності металу, що використовується у солі. Зазвичай  $\eta$  дорівнює 1 або 2 для катіона металу, який утворює сіль, одновалентного (K) або двовалентного (Ca або Mg).

Нова біологічна активність 2,5 дигідроксибензолсульфонові кислоти не залежить від зв'язку катіона з бензольним кільцем, оскільки 2,5-дигідроксибензолсульфонова кислота, рецептована з будь-якою сіллю, має схожий вплив при інгібуванні проліферації міграції та ангіогенезу клітин. У цьому винаході описано лише активність 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти, рецептованої як сіль калію та кальцію, але не слід забувати, що обсяг цього винаходу охоплює будь-яку фармацевтично прийнятну сіль сполуки. Термін "фармацевтично прийнятні солі" включає солі металів або адиційні солі, які можуть застосовуватись у фармацевтичних формах. Фармацевтично прийнятні солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти одержують з органічних або неорганічних кислот або основ традиційними способами, шляхом піддавання відповідної кислоти або основи реакції зі сполукою.

Фармацевтичні композиції, які містять 2,5-дигідроксибензолсульфову кислоту, можуть бути представлені у будь-якій формі, придатній для введення, наприклад, для системного, перорального, парентерального, уретрального, ректального або місцевого застосування, до якої можуть бути включені необхідні фармацевтично прийнятні наповнювачі для утворення потрібної форми введення.

Представлені нижче приклади пояснюють і підтверджують винахід і не повинні розглядатись як такі, що обмежують обсяг винаходу.

Приклад 1: Пояснювальний аналіз антипроліферативної здатності 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти.

Це *in vitro* дослідження здійснювали у трьох різних триразових експериментах з клітинами гліоми щура (C6 line). Клітини культивували у середовищі, яке складалося з DMEM - модифікованого способом Дульбекко середовища Ігла (Gibco, Paisley UK), 7,5% ембріональної сироватки (Gibco) 10 одиниць/мл пеніциліну (Gibco) та 10 мкг/мл стрептоміцину (Gibco). Культури тримали у вологій атмосфері при 37°C. Для оцінки впливу 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти на проліферацію клітин  $2 \times 10^4$  C6 клітин на лунку висівали у 24-лункові (діаметр 15 мм) планшети. Експериментальні культури обробляли протягом 48 годин різними мікромолярними концентраціями (мкМ) сполуки (кальцієвої або калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти). Контрольні культури жили протягом 48 годин, без додавання сполуки. Фотографії культур робили через 48 годин, застосовуючи інвертований мікроскоп, а потім культури забарвлювали кристалічним фіолетом (Merck Farma у Quimica SA, Mollet del Valles, Barcelona) і обробляли для визначення кількості клітин на лунку, застосовуючи спектрофотометрію. Як показано на Фігурі 1, обробка різними концентраціями сполуки викликає залежне від дози інгібування проліферації клітин, з забезпеченням 88% інгібування при концентрації 100 мкМ кальцієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти (А). При такій самій концентрації калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти досягали 74% інгібування (В). Показник  $IC_{50}$  становить близько 25 мкМ для кальцієвої солі і від 40 до 50 мкМ для калієвої солі. При порівнянні Фігури 1А з Фігурою 1В спостерігали, що для досягнення такого самого відсотка інгібування проліферації клітин після обробки кальцієвою сіллю сполуки для досягнення такого самого ефекту необхідна подвійна концентрація порівняно з кількістю калієвої солі. Це відбувається завдяки тому, що кальцієва сіль сполуки містить два молі активної складової (2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти), які відокремлюються від солі у водному розчині. На Фігурі 2 показано зображення культури клітин C6 через 48 годин без обробки (А), інше зображення відповідає культурі клітин C6, які обробляли протягом 48 годин концентрацією 50 мкМ кальцієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти (В), а третє зображення відповідає культурі клітин C6, які обробляли протягом 48 годин 100 мкМ калієвої солі (С). Це дослідження показує, що обробка сполукою інгібує проліферацію неопластичних клітин і підтверджує антипроліферативний вплив сполуки, який спостерігали у нормальних судинних клітинах гладенького м'яза, стимульованих *in vitro* мітогенними факторами [Pares-Herbut N et al. Int J Angiol 8: S5-S10, 1999]. Для того, щоб визначити, чи є антипроліферативна активність 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти опосередкованою цитотоксичним або проапоптозним впливом, авторами було проведено різні експери-

менти, детально описані у представленому нижче прикладі:

Приклад 2: Пояснювальний аналіз проапоптозної здатності 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти.

Цей аналіз здійснювали з клітинами C6 згідно з процедурою, описаною у прикладі 1. Для демонстрації проапоптозного впливу підданих аналізу сполук авторами було застосовано два різні способи, які виявляють внутрішньоклітинну фрагментацію ДНК та апоптозні ядра *in situ*.

Виявлення внутрішньоклітинної фрагментації ДНК.

Способи ферментного імуноаналізу для визначення кількості фрагментів ДНК, пов'язаних з гістонами, можуть вважатися прийнятними для визначення початку апоптозу [Aragane Y et al. J Cell Biol 1998; 140: 171-182]. Цей спосіб дозволяє відрізнити смерть через некроз від смерті через апоптоз, оскільки при некрозі цитоплазматична мембрана фрагментується, і ДНК виходить у культуральне середовище, тоді як при апоптозі фрагментована ДНК залишається всередині клітини, оскільки мембрана плазми залишається інтактною [Aragane Y et al. J Cell Biol 140: 171-182, 1998].

Застосовуючи комплект для виявлення відмирання клітин ELISA<sup>plus</sup> (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) згідно з інструкціями виробника, авторами було визначено фрагментацію ДНК у культурах клітин C6 ( $2 \times 10^3$ ) через 4, 16, 24 та 48 годин. Контрольні культури нічим не обробляли, тоді як до експериментальних культур додавали від 50 до 200 мкМ (Фігура 3А) калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти. Також проводили експерименти з додаванням від 25 до 100 мкМ кальцієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти (Фігура 3В). Усі експерименти здійснювали по тричі у трьох різних експериментах.

На Фігурах 3А та 3В показано: а) антипроліферативний вплив 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти опосередковується, головним чином, проапоптозною активністю; б) катіон, зв'язаний з молекулою, не визначає активності сполуки, оскільки проапоптозний вплив є майже однаковим при застосуванні кальцієвої або калієвої солі сполуки; с) найвищий проапоптозний вплив досягається у клітинах, які обробляли сполукою протягом 48 годин; д) максимальний ефект досягається при концентрації 25 мкМ для кальцієвої солі і 50 мкМ для калієвої солі, ідентичний  $IC_{50}$  у дослідженнях клітинної проліферації. Щойно довівши, що антипроліферативний механізм 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти бере участь у відмиранні клітин через апоптоз, автори кількісно визначили такий вплив шляхом мікроскопічного дослідження гліомних клітин із застосуванням представленого нижче способу.

Виявлення апоптозних ядер *in situ* (спосіб TUNEL)

Здійснювали три незалежні експерименти, кожен з яких повторювали тричі. Клітини C6 з контрольних культур та клітини з культур, які обробляли протягом 24 годин (50 мкМ та 100 мкМ кальцієвої та калієвої солей, відповідно) приклею-

вали на предметні скельця і фіксували 4% параформальдегідним буферним розчином (pH 7,4) протягом однієї години при лабораторній температурі. Після цього клітини промивали і піддавали пермеабілізації 0,1% розчином Triton X-100. Потім клітини промивали перед застосуванням способу TUNEL [(terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick and labeling [Gavrieli Y, Sherman Y, Bensasson SA. J Cell Biol 119: 493-501, 1992]. Застосовували комплект для виявлення апоптозних ядер *in situ* (комплект для виявлення відмирання клітин *in situ* від Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Пізні етапи способу виконувалися згідно з інструкціями виробника комплексу. І нарешті, клітини забарвлювали зеленим (Fluka, AG, Швейцарія). Реакція TUNEL виявляється лише в апоптозних ядрах.

Хоча дуже схожі результати отримували з кальцієвою та калієвою сіллю сполуки, яка є об'єктом винаходу, показано лише результати, отримані для калієвої солі сполуки. Клітини підраховували на 6 різних ділянках на дванадцяти скельцях, на які було наклеєно клітини з 6 контрольних культур та 6 культур, оброблених 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою (100 мкМ). Загальна кількість неапоптозних та апоптозних клітин була такою:

Клітини C6	Апоптозні ядра	Нормальні ядра
Контрольні клітини	138	5954
Оброблені клітини	3846	354

Загальна кількість оброблених клітин є нижчою, ніж загальна кількість контрольних клітин через антипроліферативний вплив сполуки.

Зображення з Фігури 4 показують ділянку експерименту контрольної культури (А та В) та іншої культури, яку обробляли сполукою (С та D), в якій було застосовано спосіб TUNEL. Як показано на зображеннях, лише два апоптозні ядра спостерігали на контрольних клітинах, тоді як у клітинах, оброблених сполукою згідно з винаходом, існує 107 апоптозних ядер і лише 8 нормальних ядер (неапоптозних).

Ці дані показують, що 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою є сполукою зі значною проапоптозною активністю, яку використовують для викликання апоптозу пухлин. Враховуючи те, що було доведено, що 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою інгібує апоптоз у нормальних людських клітинах [Braber R. Farine JC, Lora GA. Apoptosis 4: 4111-49, 1998], ця сполука має потенціал як засіб лікування раку.

Одним з механізмів, через які хіміотерапія та радіотерапія виявляються терапевтично невдалими, є неефективність цих способів у викликанні смерті клітин через апоптоз, головним чином, через гіперекспресію протиапоптозних білків у пухлинних клітинах [Sellers WR, Fisher DE. J Clin Invest 104: 1655-1661, 1999; Branch P. et al. Oncogene 19: 3138-3145, 2000]. Таким чином, проапоптозні сполуки можуть мати велике клінічне застосування як ад'юванти при лікуванні шляхом хіміотерапії та радіотерапії.

Щойно було продемонстровано проапоптозний вплив 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти, авторами було оцінено здатність цієї сполуки до збільшення антипроліферативного впливу різних цитостатичних ліків. Представлений нижче приклад демонструє, яким чином 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою може підвищувати терапевтичну ефективність різних цитостатичних сполук, які застосовуються в онкології, таких як цисплатин, вінкрисдин, паклітаксел та 5-фторурацил.

Приклад 3: Пояснювальний аналіз здатності 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти до посилення ефективності хіміотерапії

Для цього дослідження автори застосовували клітини C6, які культивували *in vitro* за таких самих умов, як описано у прикладі 1. Їх  $10^3$  клітин на лунку культивували у 24-лункових планшетах. Здійснювали три типи обробки: а) через 24 години після висівання клітини окремо обробляли кожним з нижчезазначених препаратів: цисплатином (5 мкг/мл), вінкрисдином (0,1 мкг/мл), паклітакселом (5 мкг/мл) та 5-фторурацилом (100 мкг/мл); б) через 24 години після висівання клітини разом обробляли 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою (калієва сіль, 100 мкМ) та кожним з нижчезазначених препаратів: цисплатином (5 мкг/мл), вінкрисдином (0,1 мкг/мл), паклітакселом (5 мкг/мл) та 5-фторурацилом (100 мкг/мл); в) під час висівання (0-й день) клітини попередньо обробляли 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою (калієва сіль, 100 мкМ). Наступного дня культури також обробляли кожним з нижчезазначених препаратів: цисплатином (5 мкг/мл), вінкрисдином (0,1 мкг/мл), паклітакселом (5 мкг/мл) та 5-фторурацилом (100 мкг/мл). Контрольні культури не піддавали обробці протягом 2 днів. Через 48 годин (2-й день) клітини, які мали форму, ідентичну з тими, які використовували у прикладі 1, оцінювали в усіх культурах. Це дослідження здійснювали у трьох незалежних експериментах, які повторювали тричі.

Фігура 5 (А, В, С та D) показує гістограми експериментів, які виконували для визначення впливу 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти при посиленні дії різних цитостатичних препаратів. Лікування цисплатином, вінкрисдином та 5-фторурацилом забезпечує 50% інгібування проліферації клітин C6, тоді як лікування паклітакселом забезпечує 67% інгібування клітинної проліферації. Комбіноване лікування 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою + цитостатичними препаратами (цисплатином, вінкрисдином та 5-фторурацилом) забезпечує інгібування 84% клітинної проліферації. Комбіноване лікування 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою + паклітакселом забезпечує 86% інгібування клітинної проліферації. Коли клітинні культури попередньо обробляють 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою, а потім цитостатичними препаратами цисплатином, вінкрисдином та 5-фторурацилом, досягається інгібування 90% проліферації клітин. При застосуванні паклітакселу інгібування клітинної проліферації досягає 92%.

Вицезгадані результати демонструють, що одночасне лікування з застосуванням 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти та засобів хіміотерапії посилює їх терапевтичну ефективність і, крім того, цей ефект посилення є вищим, коли клітини є попередньо обробленими 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислотою. Ці дані підтверджують доцільність застосування 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти як ад'юванта в лікуванні, пов'язаному з хіміотерапією та радіотерапією.

Приклад 4: Пояснювальний аналіз протиміграційної здатності 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти

Цей аналіз здійснювали у трьох різних триразових експериментах. Для оцінки здатності 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти до інгібування клітинної міграції використовували клітини C6 2 × 10<sup>5</sup>, культивовані *in vitro* у 20 мм планшетах. Стерильною мікропіпеткою здійснювали подовжне пошкодження (0-й день) контрольних культур та культур, оброблених 100 мкМ калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти. Робили цифрові фотографії, застосовуючи фотографічну систему, сполучену зі світловим мікроскопом, і визначали межі ділянки пошкодження за допомогою комп'ютерної морфометричної програми (Moticam. Motic. Barcelona). Знову робили фотографії через 24 години, і межі пошкодження мітили, накладаючи перші два фото (0-й день) на отримані через 24 години для розрахунку відсотка ураженої площі, вкритої мігруючими клітинами. Ці значення було представлено як відсоток регенерації, досягнутої завдяки обробці. Фігура 6 показує типовий приклад контрольного експерименту (А) та іншого експерименту, в якому клітини обробляли протягом 24 годин сполукою згідно з винаходом (В). Як можна побачити на цій Фігурі, необроблені клітини повністю регенеруються у місці пошкодження (Фігура 6А), тоді як клітини, оброблені сполукою, не здатні мігрувати та вкривати всю площу пошкодження (Фігура 6В). Фігура 7, яка представляє відсоткові дані всіх експериментів, показує, що 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислота інгібує до 64% міграції пухлинних клітин.

Приклад 5: Пояснювальний аналіз протиангіогенної здатності 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти

Для цього аналізу автори використовували хоріоалантоїсну мембрану ембріона курчати для випробування активності протиангіогенних речовин *in vivo* [Zilberberg L. et al. J Biol Chem 2003; 278: 35564-35573]. Автори використовували проангіогенну сполуку, основну форму фактора росту фібробластів (bFGF) [Meghna U et al. Blood 2003; 102: 2108-2114].

Запліднені яйця тримають в інкубаторі при 37°C з вологістю 80%. Через 4 дні роблять отвір у найвузшому кінці шкаралупи яйця для забирання 1 мл альбуміну. Після цього отвір закривають парафіновою плівкою (Parafilm M Laboratory Film Chicago IL, USA). Ця процедура дозволяє створити повітряну камеру, яка перешкоджає прилипанню ембріона до верхньої частини шкаралупи. На 13-й день інкубації шкаралупу розколюють на рівні повітряної камери для здійснення обробки. Двадцять

ембріонів обробляють 5 мкл розчину 3 мкг bFGF + 0,1% гепарину, яким просочували нітроцелюлозний паперовий диск. Після цього шкаралупу герметично заплілювали парафіновою плівкою. Наступного дня у половини ембріонів (n = 10) шкаралупу відкривають для повторного просочування нітроцелюлозного паперового диска 100 мкМ калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти, розчиненої у фізіологічному розсолі (5 мкл). Отвір у шкаралупі знову закривали парафіновою плівкою. На сімнадцятий день експеримент закінчують, фотографуючи фрагмент нітроцелюлози для порівняльного дослідження.

На Фігурі 8 представлено два зображення, які стосуються ембріона, який обробляли 3 мкг bFGF + 0, 1% гепарину (А), та іншого ембріона, до якого наступного дня додавали 100 мкМ розчину калієвої солі 2, 5-дигідроксибензолсульфонові кислоти (В). На Зображенні А показано, яким чином у нітроцелюлозний диск проникають кровоносні судини, тоді як на Зображенні В показано дуже незначне вторгнення судин у диск. Морфометрична оцінка зображень нітроцелюлозних дисків із застосуванням комп'ютерної системи (Moticam Motic. Barcelona) показує протиангіогенний вплив сполуки (площа диска, вкрита кровоносними судинами в ембріонах, оброблених bFGF + гепарином = 35 + 8,6% порівняно з площею диска, вкритого кровоносними судинами в ембріонах, оброблених bFGF + гепарином + калієвою сіллю 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти = 2 + 1,5%; р0,0001; непарний t-тест Ст'юдента). Подібних результатів досягали з застосуванням 50 мкМ кальцієвої солі сполуки. Цей експеримент показує, що сполука згідно з цим винаходом має протиангіогенну активність через здатність до нейтралізації ангіогенного впливу, викликаного bFGF.

Приклад 6: Аналіз на псоріатичних ушкодженнях

Для цього дослідження автори використовували калієву сіль 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти, рецептовану в кількості 2,5 та 5% у кремі для здійснення звичної для такого типу композицій процедури місцевого лікування шкірних хвороб. Вибрана концентрація солей 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти перебуває в діапазоні концентрацій, які застосовують для лікування діабетичних ретинопатій: 6 таблеток на день з 500 мг кальцієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонові кислоти (Benakis A et al. Therapie 1974; 29: 211-219). Як водну фазу крему, автори використовували дистильовану воду. Жирову фазу може складати цетиловий спирт, стеариновий спирт або вазелін. Ефективним емульгатором у приготуванні крему є Span. Хоча обидві композиції (2,5 та 5%) продукту виявляються клінічно ефективними, найкращої терапевтичної переваги досягають при концентрації 5%. Таким чином, автори представляють результати, одержані з 5% кількістю кислоти у композиції крему. Представлений нижче приклад пояснює рецептування ефективного крему для місцевого лікування псоріазу, і цей приклад не обмежує обсягу винаходу.

I. - Активна частина (калієва сіль 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти у кількості 5,6%)

II. - Неактивна частина (як наповнювачі використовували цетиловий спирт (2,5%), стеариловий спирт (2,5%), рідкий вазелін (30%), білий м'який парафін (20%), сорбітолеат (5%) та дистильовану воду (с.с.р. 100 г).

Клінічну ефективність лікування оцінювали згідно з показником, який дозволяє кількісно визначати ознаки десквамації (D), еритему (E) та інфільтрацію (I), до яких застосовують таку оцінку: (0) відсутні; (1) легкі; (2) помірні та (3) важкі [Freeman AK et al. J Am. Acad Dermatol 2003; 48: 564-568]. На Фігурі 9 показано три зображення: до лікування, через шість та тринадцять днів після лікування однієї хронічної псоріатичної бляшки, розташованої у виступаючій ділянці лівого ліктя, обробленої калієвою сіллю 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти у кількості 5%. Як можна спостерігати, місцеве лікування двічі на день із застосуванням крему, що містить калієву сіль 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти, забезпечує раннє (6 днів) дуже помітне "усунення" бляшки з майже повним зникненням гіперкератозу. Терапевтична ефективність крему є більш вираженою наприкінці другого тижня лікування. Лікування забезпечує суттєве зниження загальних значень показника DEI (DEI global pre-treatment =  $6 \pm 1,57$  порівняно з DEI global post-treatment =  $1 \pm 0,58$ ;  $p < 0,0001$ ; непарний t-тест Ст'юдента).

Коментарі до фігур

1. Гістограма, яка показує антипроліферативний вплив лікування різними концентраціями (A) кальцієвої та (B) калієвої солей 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти у культурах клітин C6 після 48 годин обробки. Вісь ординат: оптична густина при 595 нм; вісь абсцис: концентрація: мкМ.

2. Панель A показує вигляд контрольної культури клітин C6 через 48 годин. Панель B показує зображення культури клітин C6, які обробляли протягом 48 годин 50 мкМ 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти (кальцієва сіль). Панель C показує культуру клітин C6, які обробляли протягом 48 годин 100 мкМ калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти.

3. Зразки гістограм, на яких спостерігається, що антипроліферативний вплив 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти зумовлюється не некрозом (біла гістограма), а апоптозом (заштрихована гістограма). A: обробка кальцієвою сіллю 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти. B: обробка калієвою сіллю 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти. Вісь ординат: оптична густина при 405 нм; вісь абсцис: час у годинах.

4. Зображення гліомних клітин C6, оброблених способом TUNEL для виявлення апоптозних клітин in-situ. Апоптозні ядра показано темним кольором, а ядро та цитоплазма неапоптозних клітин показано світлим кольором. Стрілки показують апоптозне

ядро. A та B представляють контрольні клітини, C та D - клітини, оброблені 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою. Фотографії B та D відповідають збільшеному масштабові виділених фрагментів з фотографій A та C, відповідно.

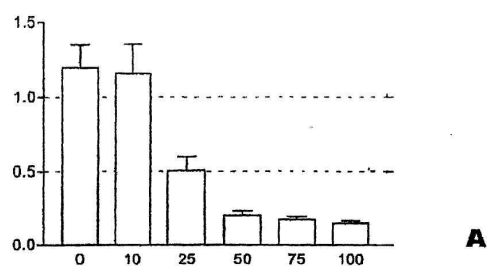
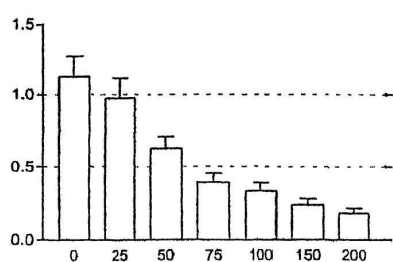
5. Гістограми, які демонструють посилюючий вплив на хіміотерапію (визначений як антипроліферативний вплив) 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти, з різними цитостатичними сполуками: A) цисплатиною (5 мкг/мл); B) вінкристином (0,1 мкг/мл); C) паклітакселем (5 мкг/мл) та D) 5-фторурацилом (100 мкг/мл). Вісь ординат: оптична густина 595 нм; вісь абсцис: біла гістограма (контроль); крапчаста (цитостатик; день 1); заштрихована гістограма (2,5-дигідроксибензолсульфонової кислота + цитостатик; день 1); клітчаста гістограма (2,5-дигідроксибензолсульфонової кислота (0-й день) + цитостатик; день 1).

6. Фотографічні зображення клітинної міграції у контрольному експерименті та інших експериментах, у яких клітини обробляли 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою (B). Контрольні клітини повністю регенерують пошкодження, зроблене в культурі, тоді як міграція клітин, оброблених 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою, була не здатна повністю відновити уражену ділянку культури. Горизонтальні лінії обмежують первісне подовжнє пошкодження, зроблене в культурах.

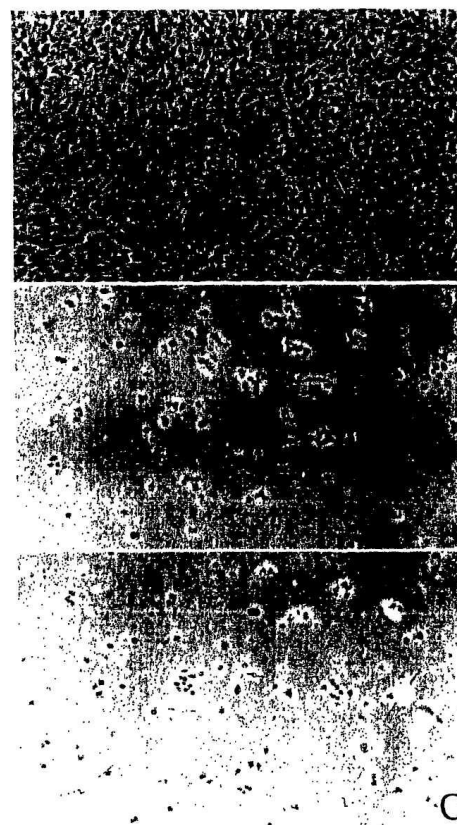
7. Гістограма, яка представляє міграційну здатність клітин C6 у контрольних культурах (біла гістограма) та культурах, оброблених 2,5-дигідроксибензолсульфоновою кислотою (чорна гістограма). Міграційну здатність виражено (вісь ординат) як відсоток регенерації (відсоток площі подовжнього пошкодження, зробленого в культурах).

8. Зображення двох ембріонів курчат з 17-денною інкубацією. Панель A показує ембріон, оброблений 3 мкг bFGF + 0,1% гепарину. Панель B показує вигляд ембріона, обробленого 3 мкг bFGF + 0,1% гепарину + 100 мкМ калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти. Панель A показує протиангіогенний вплив 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти, оскільки нітроцелюлозний диск, який застосовували як носій речовини, майже не має судин.

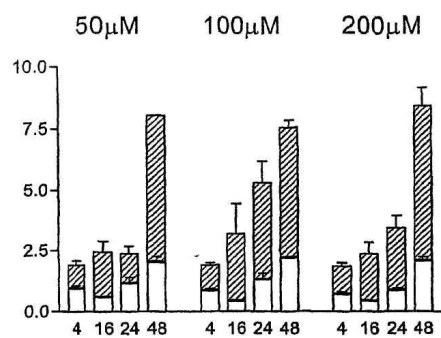
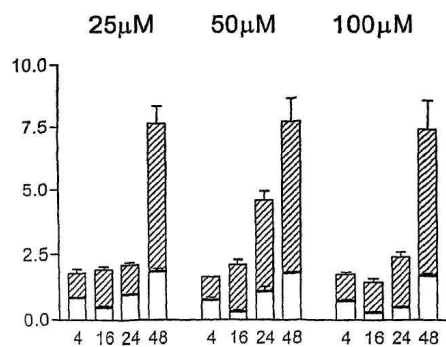
9. Зображення гіперкератозної псоріатичної бляшки, розташованої у задній ділянці лівого ліктя. Зображення A представляє вигляд псоріатичної бляшки перед початком лікування. Зображення B є виглядом тієї самої бляшки після шести днів лікування кремом, який містив 5% активного компонента - калієвої солі 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти. Зображення C показує вигляд псоріатичної бляшки після двох тижнів лікування калієвою сіллю 2,5-дигідроксибензолсульфонової кислоти у кількості 5%. Цифри, показані на зображенні, означають день, у який було зроблено фотографії.

**A****B**

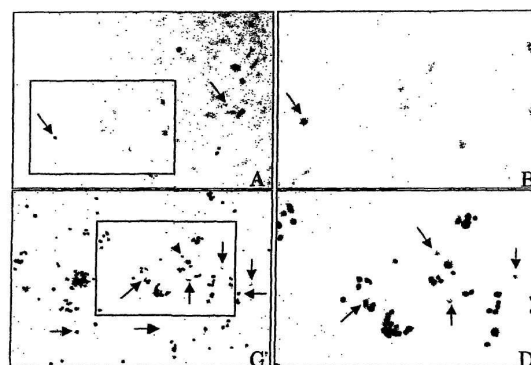
Фиг. 1



Фиг. 2

**A****B**

Фиг. 3



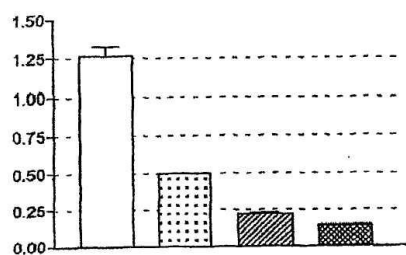
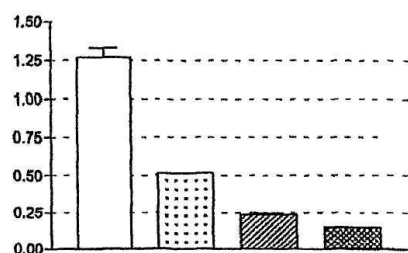
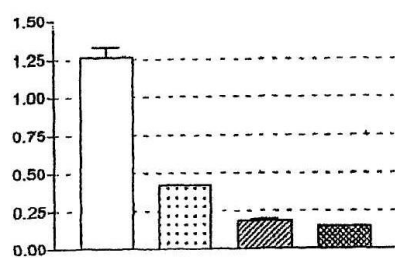
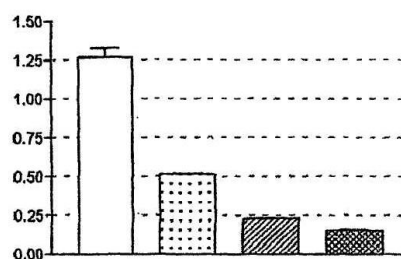
Фиг. 4



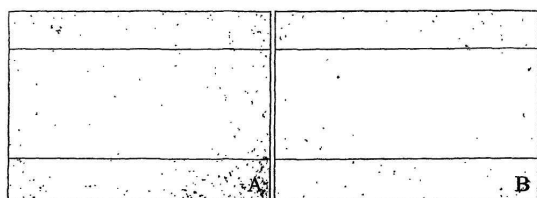
17

86399

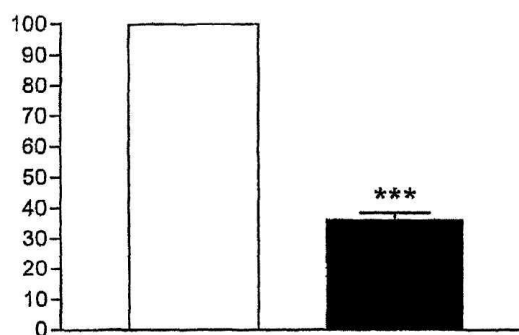
18

**A****B****C****D**

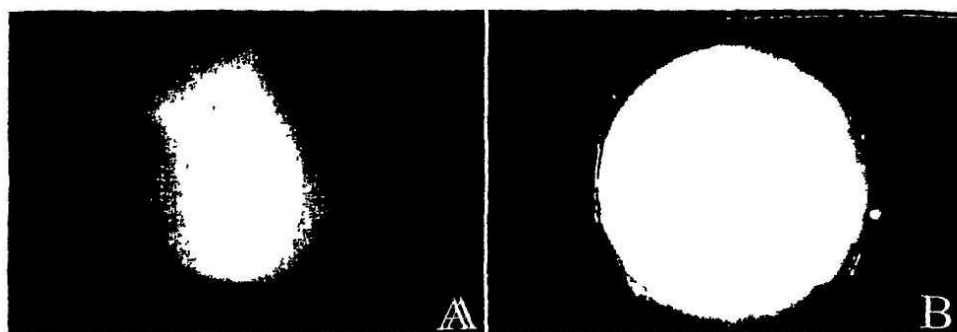
Фиг. 5



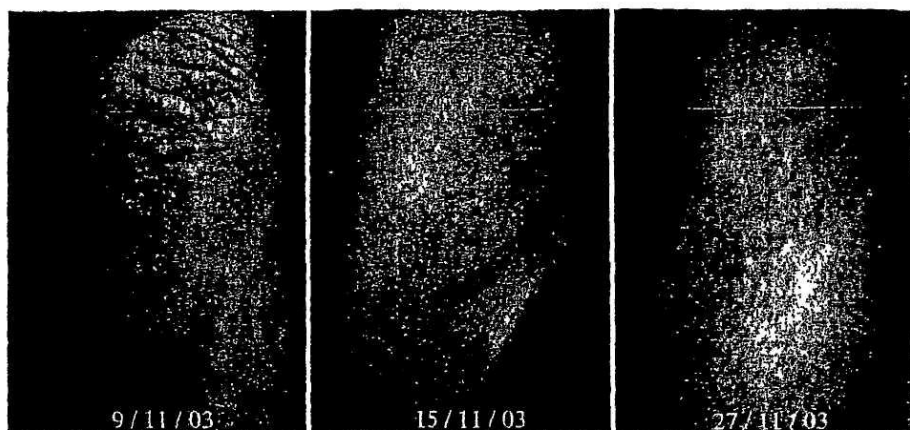
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



ФІГ. 9