



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89795** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/41
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

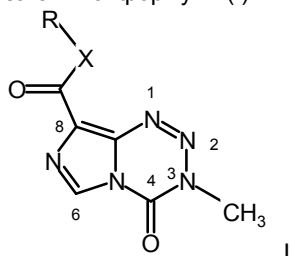
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ЕСТЕР ТЕМОЗОЛОМІДУ**

1

2

(21) a200704418
(22) 15.09.2005
(24) 10.03.2010
(86) PCT/CN2005/001477, 15.09.2005
(31) 200410072056.4
(32) 22.09.2004
(33) CN
(46) 10.03.2010, Бюл.№ 5, 2010 р.
(72) ВАН ЙОНФЕН, CN
(73) ТЯН ДЖІН ТАСЛІ ГРУП КО., ЛТД., CN
(56) CN1485327 A 31.03.2004
EP0252682 A2 13.01.1988
ZHAO L X.: 'Synthesis and Antitumor Activities of 3-Substituted 4-Oxo-3H-imidazol[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxylic Acids and Their Derivatives.' CHINESE JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY. vol. 11, no. 5, October 2001, pages 263 - 269
WANG Y ET AL: 'Synthesis and antibacterial activity of dual-action agents of a beta-lactam antibiotic with cytotoxic agent mitozolomide or temozolomide.' EUR J MED CHEM. vol. 37, no. 4, 2002, pages 323 - 332
(57) 1. Сполука 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат загальної формули (I):



де Х являє собою О або S;
R являє собою заміщений або незаміщений C3~C10 алкіл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, C3~C10 циклоалкіл, C3~C10 алкеніл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом або C3~C10 алкініл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом;
та R може мати замісник(и), де вказаний замісник(и) може являти собою C1~C6 алкіл, C1~C6 алкокси, C1~C6 алкілтіогрупу, C1~C6 алкіламіногрупу, феніл або феніл, заміщений галогеном.

2. Сполука за п. 1, де вказана сполука вибрана з групи, що складається з:
метил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
етил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
пропіл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
бутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-метилбутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-етилбутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-етилпропіл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-етиламіл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-метилгексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-3-карбоксилату,
2-метилгексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
3-метилгексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
4-метилгексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
5-метилгексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-метилгептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
2-метилгептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
3-метилгептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
4-метилгептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
5-метилгептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
6-метилгептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
аміл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
ізогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,

(13) **C2**

(11) **89795**

(19) **UA**

циклогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату та октил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату.

3. Сполука за п. 2, де вказана сполука являє собою н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат.

4. Фармацевтична композиція, що має протипухлинну активність, яка **відрізняється** тим, що містить терапевтично ефективну кількість однієї чи більше із сполук за будь-яким з пп. 1-3 як активний інгредієнт, разом з традиційними фармацевтично прийнятними носіями.

5. Фармацевтична композиція за п. 4, яка **відрізняється** тим, що вказана композиція може містити один або більше фармацевтично прийнятних компонентів кислотної природи.

6. Фармацевтична композиція за п. 5, яка **відрізняється** тим, що вказаний компонент кислотної природи вибраний з групи, що складається з олеїнової кислоти, стеаринової кислоти, лінолевої кислоти, фумарової кислоти, бензойної кислоти, винної кислоти, сорбінової кислоти, молочної кислоти, лимонної кислоти, оцтової кислоти та ЕДТА.

7. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 4-6, яка **відрізняється** тим, що вказана композиція додатково може містити один або більше фармацевтично прийнятних C3-C8 третинних спиртів або вторинних спиртів, або їх естерних або ефірних похідних.

8. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 4-7, яка **відрізняється** тим, що вказаний активний інгредієнт вводять пацієнтам в дозі 0,1-200 мг/кг маси тіла/добу.

9. Фармацевтична композиція за п. 8, яка **відрізняється** тим, що вказаний інтервал доз активного інгредієнта становить 1-20 мг/кг маси тіла/добу.

10. Фармацевтична композиція за п. 4, яка **відрізняється** тим, що вказана композиція може бути виготовлена в будь-якій з фармацевтично прийнятних лікарських форм.

11. Фармацевтична композиція за п. 10, яка **відрізняється** тим, що вказана композиція може бути виготовлена в трансдермальній лікарській формі для місцевого застосування або в лікарській формі для перорального застосування.

12. Фармацевтична композиція за п. 11, яка **відрізняється** тим, що вказана трансдермальна лікарська форма для місцевого застосування являє собою трансдермальний пластр для місцевого застосування.

13. Фармацевтична композиція за п. 12, яка **відрізняється** тим, що вказаний трансдермальний пластр являє собою пластр з контрольованим вивільненням матричного типу, пластр з контрольованим вивільненням по типу резервуара твердої речовини або пластр з контрольованим вивільненням по типу резервуара рідкої речовини.

14. Фармацевтична композиція за п. 13, яка **відрізняється** тим, що вказаний трансдермальний пластр являє собою пластр з контрольованим вивільненням по типу резервуара твердої речовини, в якому водна фаза являє собою воду та мас-

ляна фаза являє собою одну або більше субстанцій, вибраних з групи, що складається з олеїнової кислоти, ізопропілміристату, лауринової кислоти, воску, цетилового спирту, стеарилового спирту, рідкого парафіну, вазеліну, безводного ланоліну, стеаринової кислоти, бавовняної олії, рицинової олії та ліноленової кислоти.

15. Фармацевтична композиція за п. 14, яка **відрізняється** тим, що вказана масляна фаза являє собою олеїнову кислоту або ізопропілміристат.

16. Фармацевтична композиція за п. 13, яка **відрізняється** тим, що вказаний трансдермальний пластр являє собою пластр з контрольованим вивільненням по типу резервуара, що містить непроникну матрицю, рідкий лікарський засіб, мембрану, що сповільнює швидкість вивільнення, PSAs та шар вивільнення, де:

непроникна матриця являє собою одну або більше субстанцій, вибраних з групи, що складається з поліетилену, полівінілхлориду, нітрогліцерину, полідиметилсилоксану, полівінілпіролідону, полівінілового спирту, комплексу поліетеноксида, поліетиленгліколю, монометилового ефіру поліетиленгліколю або диметилового ефіру поліетиленгліколю, поліетиленгліколю сукцинату та вітаміну Е ТПГС, бавовни та вовни;

вказана мембрана, що сповільнює швидкість вивільнення, вибрана з групи, що складається з мембрани із співполімеру етилену та вінілацетату, мембрани з поліуретану або мембрани з глікольдіацетату; та

вказаний PSAs вибраний з групи, що складається з чутливої до тиску полісилоксанової смоли або чутливої до тиску поліакрилатної смоли.

17. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що вказана матриця являє собою поліетилен або полівінілхлорид.

18. Фармацевтична композиція за п. 13, яка **відрізняється** тим, що вказаний трансдермальний пластр для місцевого застосування являє собою пластр з контрольованим вивільненням матричного типу, де допоміжна клейка матриця лікарського засобу вибрана з групи, що складається з полівінілхлориду, поліакрилату, полідиметилсилоксану, полівінілпіролідону, полівінілового спирту, водного гелю, що виготовлений з гелю, полівінілпіролідону, комплексу полівінілпіролідону та поліетиленоксида, монометилового ефіру поліетиленгліколю або диметилового ефіру поліетиленгліколю, поліетиленгліколю сукцинату та ВЕ ТПГС.

19. Фармацевтична композиція за п. 18, яка **відрізняється** тим, що допоміжна липка матриця лікарського засобу являє собою поліакрилат.

20. Фармацевтична композиція за п. 10, яка **відрізняється** тим, що вказана лікарська форма являє собою таблетку, пігулку, диспергований порошок, капсулу, гранулу, емульсію, розчин, суспензію, сироп, твердий супозиторій для вагінального або ректального введення.

21. Спосіб одержання композиції за пп. 14 або 15, який **відрізняється** тим, що в ньому здійснюють наступні стадії:

зважування відповідної кількості сполуки за п. 1 як активного інгредієнта та подрібнення до стану тон-

кого порошку, ретельне перемішування водної фази, масляної фази, поверхнево-активної речовини та необхідних носіїв з подальшим змішуванням з подрібненим порошком лікарського засобу, одержану суміш змішують та мелють з одержанням мікроемульсії; додавання до суміші відповідної кількості мембрани, що сповільнює швидкість

вивільнення, та чутливої до тиску клейкої субстанції з ретельним перемішуванням; дегазація шляхом збереження тепла з використанням водяної бані та розподіл на поліетиленовій матриці; сушіння та розрізання на маленькі шматочки з одержанням вказаного пластира з контрольованим вивільненням по типу резервуара твердої речовини.

Даний винахід відноситься до галузі медицини. Більш конкретно, даний винахід стосується похідних темозоломід-8-карбоксилату, способу їх одержання, композицій на їх основі та застосування похідних і композицій у виробництві лікарського засобу для лікування пухлини, конкретно, застосування сполуки і композиції в препараті для перорального або трансдермального застосування, призначеному для лікування пухлини, такої як карцинома шкіри, карцинома мозку та лімфома.

Темозоломід (в даному описі має назву "ТМЗ"), алкілувальний засіб для лікування карциноми, володіє протипухлинною біологічною активністю широкого спектру дії [L.H. Tsang, et al. *Cancer Chemother Pharmacol.* 27 (1991): 342-346], і зокрема, володіє біологічною активністю, придатною для лікування нейроглоїми (карцинома мозку) та злоякісної меланоми (карцинома шкіри). У деяких західних країнах ТМЗ в капсулах зареєстрований для застосування в лікуванні злоякісної нейроглоїми. WO 0057867 описує спосіб застосування ТМЗ в циклічній схемі. ТМЗ в капсулах також зареєстрований для клінічного застосування в Китаї. Фаза II клінічних випробувань показала, що ТМЗ володіє здатністю виликовувати злоякісну меланому [N.M. Bleehen, et al. *J. Clin. Oncol.* 13 (1995): 910-913], а нещодавні клінічні випробування фази III виявили, що з точки зору лікування злоякісної меланоми ТМЗ має таку ж активність, як дакарбазин [M.R. Middleton, et al. *J. Clin. Oncol.* 18 (2000): 158-166], навіть з подібними побічними ефектами, такими як лейкоцитопенія, нудота, блювання, випадіння волосся, червоні висипи та закріп. Крім того, пероральне введення ТМЗ продемонструвало мієлотоксичність, що обмежує дозу [A.M. Heimberger, et al. *Clin. Can. Res.* 6 (2000): 4148-4153]. Попереднє дослідження різних лікарських форм продемонструвало, що інтратекальне ін'єкційне введення розчину ТМЗ може зменшити побічні ефекти [J. H. Sampson, et al. *Clin. Can. Res.* 5 (1999): 1183-1188]. Схоже, що препарат ТМЗ для трансдермального введення є ідеальним для виликування карциноми шкіри, особливо на ранніх стадіях. Кілька досліджень довели, що місцеве застосування тореміфену в місці карциноми може забезпечувати високі місцеві концентрації при зниженні системної концентрації [L. Soe, et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39 (1997): 513-520], що сприяє зниженню системної токсичності.

Загалом, підшкірне введення обумовлюється як бар'єром шкіри, так і фізико-хімічними властивостями лікарського засобу. Нестабільність і нерозчинність вказаного лікарського засобу переш-

коджують введенню його в лікарські форми. Наприклад, опубліковані в WO0057867 дослідження показали, що його лікарського засобу проникати крізь штучну шкіру (силіконова мембрана), шкіру людини та шкіру щура робить неможливим введення даного лікарського засобу в препарати для трансдермального введення. Зважаючи на це, сфера застосування ТМЗ буде істотною мірою обмежена.

Раніше з метою модифікації структури були синтезовані численні похідні, більшість з яких стосувалася заміни групи при атомі азоту №3 та модифікації групи при атомі азоту амідної групи №8. Загальна формула, описана в EP0252682 (1987), заявляє метил-, етил-, пропіл- та бутил-темозоломід-8-карбоксилати, але не розкриває їх фармакологічну дію та активність з точки зору лікування різних видів карциноми.

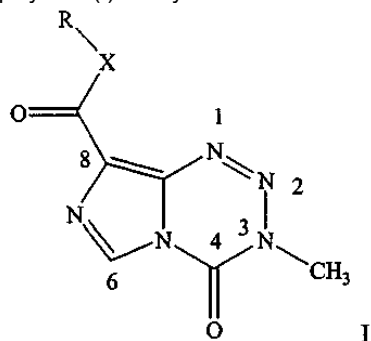
З іншого боку, сполуки імідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-4-ону, звичайно представлені ТМЗ, мають спільну рису настільки низької розчинності, що вони тільки з великими зусиллями можуть бути розчинені в будь-яких розповсюджених розчинниках, таких як етилацетат, дихлорметан та вода. Вони демонструють слабку розчинність (приблизно 1~5%) в суміші органічного розчинника та води, наприклад, у водному розчині оцтової кислоти, ацетонітрилу, ацетону, метанолу або етанолу, з концентрацією 1~10%. Навіть в апротонному полярному розчиннику ДМСО їх розчинність становить приблизно 5%. Крім того, іншою особливістю даних сполук є їх нестабільність, що виявляється не просто в їх чутливості до дії світла, але більш того, в їх чутливості до лужних середовищ із значенням рН більше 7 та середовищ, що містять нуклеофільні групи, наприклад, сполуки, що містять амідогенні, гідроксильні та меркаптогрупи. Наприклад, середовище із значенням рН більше 7 призведе до швидкого розкладу та зміни кольору (червоний) вказаних сполук; те ж саме може відбуватися в метанолі та етанолі. Таким чином застосування метанолу та етанолу як солюбілізаторів у виробництві препаратів є обмеженим. Отже, дуже бажаним виглядає створення нової біологічно активної сполуки і пошук способів підвищення її стабільності та розчинності для використання у фармацевтичній промисловості.

Таким чином, об'єктом даного винаходу є одержання похідних 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату загальної формули (I) та способи їх одержання, а також композиції, що містять вказані похідні і способи одержання таких композицій.

Винахідниками було виявлено, що похідні 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату загальної формули (I) та композиції, що їх містять, володіють протипухлинною активністю і будуть використовуватися для лікування різних видів карциноми, особливо карциноми шкіри, карциноми мозку та лімфатичної карциноми, тощо. Таким чином, іншим об'єктом винаходу є застосування похідних 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату загальної формули (I) та композицій, що їх містять, у виробництві лікарських засобів для лікування різних видів карциноми, де вказані види карциноми включають карциному шкіри, карциному мозку та лімфатичну карциному, тощо.

Інший об'єкт винаходу полягає в пропонуванні різноманітних препаратів, що володіють біологічною протипухлинною активністю та містять похідні темозоломід-8-карбоксилату загальної формули (I) як активний(і) інгредієнт(и), особливо препарати для перорального застосування і трансдермальні пластирі для місцевого застосування (проникнення крізь шкіру). Вказані трансдермальні пластирі для місцевого застосування включають пластир з контрольованим вивільненням матричного типу, пластир з контрольованим вивільненням по типу резервуару твердої речовини або пластир з контрольованим вивільненням по типу резервуару рідкої речовини.

Структура вказаного 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату за даним винаходом представлена загальною формулою (I) наступним чином:



де X являє собою O або S;

R являє собою заміщений або незаміщений C3~C10 алкіл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, C3~C10 циклоалкіл, C3~C10 алкеніл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом або C3~C10 алкініл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом;

Додатково, R може містити замісник(и), де вказані замісник(и) можуть являти собою C1~C6 алкіл, C1~C6 алкокси, C1~C6 алкілтіогрупу, C1~C6 алкіламіногрупу, феніл або феніл, заміщений галогеном.

Переважно, X являє собою O.

У викладеному вище визначенні термін C3~C10 алкіл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом в даному описі являє собою насичений вуглеводневий радикал з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, що містить 3-10 атомів вуглецю, наприклад пропіл, бутіл, аміл, гексил,

гептил, октил, ноніл або децил і т.п. та всі їх ізомери, такі як ізопропіл, ізобутіл, трет-бутіл, ізогексил або ізо-гептил, і т.д. Переважний R вибраний з групи, що складається з метилу, етилу, пропілу, ізопропілу, н-бутилу, 1-метил-пропілу, 2-метил-пропілу, амілу, 1-метил-бутилу, 2-метил-бутилу, 3-метил-бутилу, гексила, 1-метил-амілу, 2-метил-амілу, 3-метил-амілу, 4-метил-амілу, гептилу, 1-метил-гексила, 2-метил-гексила, 3-метил-гексила, 4-метил-гексила, 5-метил-гексила, октилу, 1-метил-гептилу, 2-метил-гептилу, 3-метил-гептилу, 4-метил-гептилу, 5-метил-гептилу, 6-метил-гептилу, 1-етил-пропілу, 1-етил-бутилу, 1-етил-амілу, 2-етил-амілу або 3-етил-амілу. Більш переважний R являє собою н-гексил, ізогексил та циклогексил. Найбільш переважний R являє собою н-гексил.

У відповідності до описаних вище груп, похідні ТМЗ-8-карбонової кислоти включають:

метил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
етил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
пропіл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
бутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
1-метил-бутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
1-етил-бутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
1-етил-пропіл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
1-етил-аміл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
1-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
2-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
3-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
4-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
5-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
1-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
2-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
3-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
4-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
5-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
6-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
аміл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
циклогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;
ізогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат;

гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат та октил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо [5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат.

Більш переважними є н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат, ізогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат та циклогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат; найбільш переважним є н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін C3~C10 циклоалкіл в даному описі означає циклічний насичений вуглеводневий радикал, що містить 3-10 атомів вуглецю, такий як циклопропіл, циклобутил, циклоаміл, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклононіл або циклодецил, і т.д.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін C3~C10 алкенільний ланцюг означає вуглеводневий радикал, що містить 1, 2 або 3 ненасичені подвійні зв'язки та 3-10 атомів вуглецю, такий як пропеніл, бутеніл, пентеніл, гексеніл, гептеніл та гептадісеніл, і т.д.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін C3~C10 алкінільний ланцюг означає вуглеводневий радикал, що містить 1, 2 або 3 ненасичених потрійних зв'язки та 3-10 атомів вуглецю, такий як пропініл, бутиніл, пентиніл, гексиніл та гептиніл, і т.д.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін C1~C6 алкіл, як визначено вище, означає алкіл з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, що містить 1-6 атомів вуглецю, такий як метил, етил, пропіл, бутіл, аміл, гексил і т.п., та також всі їх ізомери.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін C1~C6 алкокси означає алкіл, наведений вище, що містить атом кисню, такий як метокси, етокси, пропокси, бутокси, пентокси, гексилокси і т.п., та всі їх ізомери.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін C1~C6 алкілтіогрупа означає алкоксил, наведений вище, в якому атом кисню замінений на атом сірки, такий як метилтіо, етилтіо, пропілтіо, бутилтіо, амілтіо, гексилтіо і т.п., та всі їх ізомери.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін C1~C6 алкіламіногрупа означає аміногрупу, що містить один або два алкільних радикали, як визначено вище, таку як метиламіно, етиламіно, диметиламіно, бутиламіно, аміламіно, гексиламіно і т.п., та всі їх ізомери.

У наведеному вище визначенні загальної формули термін галоген означає фтор, хлор, бром або йод.

Сполуки загальної формули (I) одержують за наступним способом.

При перемішуванні ТМЗ змішують з концентрованою сірчаною кислотою. Натрію нітрит розчиняють у воді і потім по краплях додають до описаної вище суміші на льодяній бані при температурі нижче 15°C, після чого перемішують при кімнатній

температурі протягом ночі. До одержаної суміші безперервно додають лід та охолоджують на льодяній бані протягом 1 год. Одержаний твердий продукт ТМЗ кислоту відокремлюють фільтрацією та сушать під вакуумом.

Суміш безводних ДМФА та ТГФ впорскують у колбу, заповнену ТМЗ кислотою та Рубгор, і перемішують до повного розчинення твердої речовини, після чого в умовах льодяної бані додають 4-диметиламінопіридин (DMAP). Далі відповідну кількість безводного вуглеводневого спирту або меркаптану впорскують до одержаної суміші та продовжують реакцію протягом 30 хвилин, після чого перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Після завершення реакції суспензію фільтрують крізь ліжку Бюхнера. Одержаний маточник піддають дистиляції; до залишку додають лід та екстрагують етилацетатом (10мл×3). Етилацетатні фракції об'єднують та сушать за допомогою безводного магнію сульфату. Етилацетат видаляють за допомогою роторного випарювача з одержанням залишку. Залишок, що являє собою кінцевий продукт, далі очищують на колонці з силікагелем та одержують цільову сполуку після випаровування розчинників.

Продукт ідентифікований за допомогою ІЧ-спектра, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР та МС.

У відповідності до іншого аспекту винаходу, пропонуються композиції, що містять вказані похідні 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, та способи їх одержання.

Фармацевтичні композиції за винаходом володіють протипухлинною активністю, причому вказані композиції містять терапевтично ефективну кількість однієї чи більше сполук загальної формули (I), як активні інгредієнти, разом з традиційними фармацевтично прийнятними носіями. Вказані фармацевтично прийнятні носії являють собою носії, відомі з рівня техніки, такі як рідкі або тверді допоміжні речовини, розбавлювачі, зволожувальні засоби, консерванти, засоби для маскування смаку та барвники, і т.д.

Композиції за винаходом включають одну або більше сполук вказаної загальної формули (I), як активний(і) інгредієнт(и). Переважні сполуки загальної формули (I) вибрані з групи, що складається з:

метил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
етил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
пропіл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
бутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-метил-бутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-етил-бутил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-етил-пропіл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,
1-етил-аміл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату,

1-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 2-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 3-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 4-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 5-метил-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 1-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 2-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 3-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 4-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 5-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, 6-метил-гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, аміл-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, ізо-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, циклогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, гептил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату та октил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату.

Більш переважними сполуками є н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат, ізо-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат та циклогексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат. Найбільш переважною сполукою є н-гексил-3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилат.

Додатково, композиції за винаходом можуть включати фармацевтично прийнятні компоненти кислотної природи, наприклад, допоміжні речовини кислотної природи, які використовуються в фармацевтичній промисловості, такі як олеїнова кислота, стеаринова кислота, ліноленова кислота, фумарова кислота, бензойна кислота, винна кислота, сорбінова кислота, молочна кислота, лимонна кислота, оцтова кислота, ЕДТА, і т.д. Такі субстанції кислотної природи виконують роль стабілізатора для сполук загальної формули (I).

Винахідниками також було виявлено, що розчинність та кількість в середовищі ТМЗ-8-карбоксилату, активного інгредієнта композицій, буде збільшуватися при додаванні 0,5-20% (мас), переважно 1-10% (мас.) фармацевтично прийнятного вторинного спирту або третинного спирту, на базі загальної маси композиції. Причому, переважним спиртом є С3~С8 вторинний спирт або третинний спирт, такий як ізопропанол, ізобутиловий спирт, ізоаміловий спирт, трев-бутиловий спирт або їх естерні похідні або ефірні похідні, такі як

тригліцерид та полігліколевий ефір. Тим часом, вказані субстанції можуть використовуватися як солюбілізатор для композицій та лікарських форм іншого типу, що містять похідні ТМЗ-8-карбоксилату або інші імідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-4-они.

Композиція за винаходом може бути виготовлена у будь-якій з традиційних фармацевтичних лікарських форм. Конкретно, лікарські форми розробляють на базі наступних факторів: бажаний ефект, властивості активних інгредієнтів, дозування, вік, стать і стан захворювання пацієнтів. Вказані лікарські форми включають лікарські форми, придатні для введення, наприклад, таблетку, пігулку, диспергований порошок, капсулу, гранулу, емульсію, розчин, суспензію, сироп, твердий супозиторій для вагінального або ректального введення, а також пластр для місцевого застосування. Переважною є трансдермальна лікарська форма для місцевого застосування або лікарська формула для перорального застосування. Найбільш переважною є трансдермальна лікарська форма для місцевого застосування.

Композиція та всі її лікарські форми за винаходом можуть бути виготовлені за будь-яким способом, добре відомим в галузі фармації.

У відповідності до винаходу, одна з лікарських форм, придатних для похідних 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, являє собою препарат для перорального застосування, в тому числі тверді та рідкі препарати, зокрема тверді препарати для перорального застосування включають таблетку, пігулку, диспергований порошок, капсулу та гранули, і т.д. В ході процесу виготовлення твердих лікарських форм, біологічно активний агент, похідні ТМЗ-8-карбоксилату, може не бути змішаний з іншими інгредієнтами, або може бути змішаний щонайменше з одним інертним розбавлювачем, в тому числі кальцію карбонатом, крохмалем, альгіновою кислотою або лактозою, і т.д., та з субстанцією кислотної природи, такою як фумарова кислота, винна кислота, сорбінова кислота та лимонна кислота, і т.д., які можуть бути додані до лікарської форми. На додаток до описаних вище компонентів, інші компоненти можуть бути включені в лікарські форми, наприклад, змашувальна речовина, така як стеарат магнію. Крім того, похідні ТМЗ-8-карбоксилату можуть бути введені в рідкі лікарські форми для перорального застосування, в тому числі емульсію, розчин, суспензію та сироп, і т.д. У згаданих вище рідких лікарських формах завжди присутня водна рідина, яка містить поверхнево-активну речовину або рідкий парафін як інертні розбавлювачі. Крім інертних розбавлювачів, також можуть бути включені інші добавки, наприклад, зволожувальні агенти, суспендувальні агенти, такі як полівінілпіролідон (ПВП), підсолоджувальні агенти, агенти для маскування смаку, консерванти та ароматизатори.

Іншою фармацевтичною лікарською формою, придатною для введення похідних 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, є супозиторій, в тому числі твердий супозиторій для вагінального та ректального вве-

дення. Окрім традиційних допоміжних речовин, з метою забезпечення пролонгованого та контрольованого вивільнення вказаний супозиторій загалом включає полімер, що розкладається в біологічному середовищі, такий як полімолочна кислота (PLGA), поліангідрид та полі(змішаний ангідрид) ((поліангідридний співполімер полі(1,3-біс-(*n*-карбоксіфенокси)пропан)-ко-(себаціновий ангідрид) або (CPP:SA)).

Зважаючи на властивості похідних 3,4-дигідро-3-метил-4-оксоімідазо[5,1-*d*]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксилату, здатних проникати крізь шкіру, найбільш переважними лікарськими формами для них є трансдермальні лікарські форми для місцевого застосування, в тому числі настоянка, суспензія, емульсія, мазь, гель, супозиторій, плівка та пластир, і т.д. Як правило, трансдермальні лікарські форми для місцевого застосування включають такі допоміжні речовини, як масляне середовище, поверхнево-активна речовина і т.п.

Вказане масляне середовище, яке використовується в трансдермальних лікарських формах для місцевого застосування, вибирають з групи, що складається з олеїнової кислоти, ізопропілміристату (ІПМ), лауринової кислоти, воску, цетилового спирту, стеарилового спирту, рідкого парафіну, вазеліну, безводного ланоліну, стеаринової кислоти, бавовняної олії, рицинової олії, ліноленової кислоти і тригліцериду, тощо. Вказану широко застосовувану поверхнево-активну речовину вибирають з групи, що складається з фосфоліпиду, субстанції по типу Мурґ, субстанції по типу Brj, субстанції по типу Твіну, акацієвої камеді, трагакантової камеді, глютину та вітаміну Е ТПГС (ВЕ ТПГС), і т.д.

Переважні трансдермальні пластирі ТМЗ-8-карбоксилату для місцевого застосування діляться на дві групи: резервуарного та матричного типу. Матричний тип може бути поділений на єдину матрицю (AM) та поліматрицю (PM). Тип резервуару включає систему резервуару рідини (LRS) і систему резервуару твердої речовини (SRS), яка складається з багатошарової липкої (MLA) та багатошарової полімерної матриці (MLM). В основному, трансдермальні лікарські форми ТМЗ-8-карбоксилатів для місцевого застосування як матричного типу, так і резервуарного типу істотною мірою включають: матрицю, полімерні матеріали, резервуар лікарського засобу (розчин або суспензію лікарського засобу), мембрану, що сповільнює швидкість вивільнення, чутливі до тиску клейкі речовини (PSAs) та шар вивільнення для захисту PSAs. Додаткове обговорення наведено нижче.

Пластир типу резервуару твердої рідини: матриця являє собою прозору та стабільну мікроемульсію та її лікарські форми, утворені водною фазою, масляною фазою та поверхнево-активними речовинами при різних співвідношеннях, що поділяються на пластир типу резервуару рідини і типу резервуару твердої речовини. У вказаному пластирі типу резервуару твердої речовини як масляна фаза може бути вибрана олеїнова кислота або ізопропілміристат (ІПМ), а також лауринова кислота, віск, цетиловий спирт, стеариловий спирт, рідкий парафін, вазелін, безводний ланолін, стеари-

нова кислоти, бавовняна олія, рицинова олія та ліноленова кислота можуть бути вибрані для створення масляної фази.

Переважна масляна фаза для пластиру типу резервуару твердої речовини ТМЗ-8-карбоксилату за винаходом являє собою ізопропілміристат (ІПМ) або олеїнову кислоту, переважна водна фаза являє собою воду, та переважна поверхнево-активна речовина являє собою ВЕ ТПГС та лимонну кислоту.

Пластир контрольованого вивільнення типу резервуару для рідини виготовляють шляхом термічного топлення непроникої матриці (або так званої матриці), рідкого лікарського засобу, мембрани, що сповільнює швидкість вивільнення, PSAs та шару вивільнення.

Структура кожної частини пластиру типу резервуару рідини ТМЗ-8-карбоксилату за винаходом є наступною:

Матриця, тобто непроника матриця, загалом може бути синтезованою з полімерних матеріалів, що володіють проникністю або непроникістю, таких як поліестер, поліетилен, полівінілхлорид (ПВХ), полі(вініліденхлорид) (ПВДХ) та поліуретан, і т. д., а також з природних полімерних матеріалів, таких як бавовна або вовна, тощо. Матриця за винаходом може бути вибрана з групи, що складається з ПВХ, нітрогліцерину (Transdermal®), полідиметилсилоксану (Nitrodisc®), ПВП, полівінілового спирту (Nitro-Dur® I), комплексу поліетеноксида, ПЕГ, всіх похідних ПЕГ, таких як монометилловий ефір поліетиленгліколю або диметилловий ефір поліетиленгліколю, поліетиленгліколь сукцинат (ТПГС) та ВЕ ТПГС, і т.д. Переважними є поліетилен, полівінілхлорид, ПВДХ, поліуретан або бавовна.

Переважно, мембрана, що сповільнює швидкість вивільнення, являє собою мембрану, утворену співполімером етилену та вінілацетату, або гомогенні мембрани, такі як мембрана з поліуретану та мембрана з глікольдіацетату. PSAs являє собою унікальну біоадгезивну, переважно чутливу до тиску полісилоксанову або чутливу до тиску поліакрилатну смолу.

Пластир контрольованого вивільнення типу резервуару за винаходом може бути виготовлений за способом, що включає наступні стадії: зважування відповідної кількості *n*-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату та подрібнення його до стану тонкого порошку, додавання водної фази, такої як вода, масляної фази, такої як олеїнова кислота і т.д., та поверхнево-активної речовини, такої як ВЕ ТПГС і т.д.; ретельне змішування; додавання подрібненого лікарського засобу, помел одержаної суміші з утворенням мікроемульсії; з наступним додаванням мембрани, що сповільнює швидкість вивільнення, такої як мембрана, утворена співполімером етилену та вінілацетату, та відповідної кількості PSAs, ретельне перемішування; дегазацію шляхом збереження тепла з використанням водяної бані та розподіл на поліетиленовій матриці; сушіння та розрізання на маленькі шматочки з одержанням цільового продукту.

Вказані пластирі матричного типу за винаходом з єдиною клейкою матрицею виготовляють за

способом, що включає наступні стадії: диспергування лікарського засобу в PSAs, з якого буде здійснюватися контрольоване вивільнення лікарського засобу. Особливості системи контрольованого вивільнення: тонший об'єм, більш простий технічний процес та легша промислова відтворюваність. Склад допоміжних речовин клейкої матриці лікарського засобу за винаходом вибирають з групи, що складається з природних або синтетичних полімерів, в тому числі полівінілхлориду, поліакрилату, полідиметилсилоксану, та гідрофільних полімерів, таких як ПВП, полівініловий спирт, водний гель, виготовлений з гелю (наприклад, Prostep®), комплексу ПВП та поліетеноксида, ПЕГ та його похідних, таких як монометиловий ефір поліетиленгліколю або диметиловий ефір поліетиленгліколю, поліетиленгліколь сукцинату та ВЕ ТПГС. Переважним є поліакрилат.

Звичайно, вказаний ТМЗ-8-карбоксилат вводять в дозах 0,1~200мг/кг маси тіла/день, переважно, 1~20мг/кг маси тіла/день.

Дослідження розчинності в ліпідах, стабільності та розчинності ТМЗ-8-карбоксилату

Дослідження показали, що в порівнянні з ТМЗ, розчинність похідних ТМЗ-8-карбоксилату в ліпідах є значно кращою. Наприклад, якщо брати Log P як стандарт, Log P для ТМЗ становить -0,66, тоді як Log P для н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату становить 2,56. Це означає, що н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилат являє собою ідеальний лікарський засіб для місцевого трансдермального застосування (спосіб вимірювання Log P див. у Leo and Hansch. Chemical Reviews 71 No.6, December 1971 (Partition Coefficients and Their Uses, Leo A., Hansch C. and Elkins D.).

Винахідниками було виявлено, що стабільність може бути істотно збільшена у випадку похідних ТМЗ-8-карбоксилату окремо або разом з іншими імідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-4-онами в кислих умовах (pH 1~6,5), одержаних додаванням фармацевтично прийнятних компонентів кислотної природи. Отже, стабільність активних інгредієнтів буде істотною мірою підвищуватися, якщо похідні ТМЗ-8-карбоксилату будуть застосовуватися як активні інгредієнти в рідкій лікарській формі, такій як настоянка, суспензія, емульсія та ін'єкційні лікарські форми, а також в твердій лікарській формі, такій як мазь, супозиторій та плівка. Вказані субстанції кислотної природи включають олеїнову кислоту, стеаринову кислоту, ліноленову кислоту, фумарову кислоту, бензойну кислоту, винну кислоту, сорбінову кислоту, молочну кислоту, лимонну кислоту, оцтову кислоту, ЕДТА і т.п.

Крім того, винахідниками також було виявлено, що розчинність та кількість ТМЗ-8-карбоксилату, активного інгредієнта композиції, в середовищі буде збільшуватися при додаванні 0,5%~20% фармацевтично прийнятного вторинного спирту або третинного спирту, такого як ізопропанол, ізобутиловий спирт, ізоаміловий спирт, трет-бутиловий спирт або їх естерні або ефірні похідні, такі як тригліцерид, полігліколевий ефір. Відповідно, вторинний спирт або третинний спирт, такий як ізопропанол, ізобутиловий спирт, ізоаміловий спирт, трет-бутиловий спирт, і т. д. може

використовуватися як солюбілізатор в композиції, що містить похідні ТМЗ-8-карбоксилату та інші імідазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-4-они.

Одержані дані підтверджують, що винахід забезпечує протипухлинну композицію, яка містить одне або більше похідних ТМЗ-8-карбоксилату, фармацевтично прийнятні речовини кислотної природи, необов'язково містить фармацевтично прийнятний вторинний спирт або третинний спирт та їх похідні, а також фармацевтично прийнятні допоміжні речовини та/або носії. Винахід також пропонує різноманітні препарати, виготовлені на основі композиції за винаходом.

Наступні експерименти з дослідження фармацевтичної активності метил-ТМЗ-8-карбоксилату, бутил-ТМЗ-8-карбоксилату та н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату in vitro проти карциноми наведені з метою ілюстрації їх ефективності.

Дослідження здатності ТМЗ-8-карбоксилату вбивати пухлинні клітини in vitro

Експеримент проводили для метил-ТМЗ-8-карбоксилату, бутил-ТМЗ-8-карбоксилату, н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату та ТМЗ кислоти, яка відома як активна сполука проти карциноми, з використанням ін'єкції фторурацилу (10мл:0,25г, придбаний у Xudong Pharmaceutical Co. Ltd, номер серії 000612), як лікарського засобу для позитивного контролю. Штами ракових клітин, які використовували в експериментах, включали НСТ-8 (клітини карциноми ободової кишки людини), А549 (клітини карциноми легень людини), МСF-7 (клітини карциноми молочної залози людини), Bel-7402 (клітини карциноми печінки людини), BGC-823 (клітини карциноми шлунку людини) та MV3 (клітини меланоми людини).

Лікарські засоби та реактиви

ТМЗ кислота являє собою білий порошок; метил-ТМЗ-8-карбоксилат, бутил-ТМЗ-8-карбоксилат та н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилат, білі лускаті кристали, одержували за способом, описаним у Прикладі 2; фторурацил для ін'єкцій (10мл:0,25г): як лікарський засіб для позитивного контролю, виробник Xudong Pharmaceutical Co. Ltd, номер серії 000612; RPMI: виробник GIBCO; теляча сироватка: виробник Sijiqing bio-engineer material Co. Ltd, Hangzhou; та МТТ: виробник Bebcos.

Штами клітин

Всі штами ракових клітин - НСТ-8, А549, МСF-7, Bel-7402, BGC-823, MV3 та В16 - були вирощені і культури перенесені з Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences та Peking Union Medical College.

Прилад: BIORAD 550 для мічення ферментів.

Метод:

Використовували пробу відновлення солі тетразолію [3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід, МТТ]. Всі культивовані клітини карциноми збирали, готували суспензію клітин 1×10^4 /мл в розчині для культивування RPMI 1640, що містить 10% телячої сироватки, та інокулювали в 96-ячейкові планшети для культивування, 100мкл на ячейку (містить 1000 ракових клітин). Після проходження 24 год культивування в термостому інкубаторі з 5% CO₂ при температурі 37°C додавали лікарські засоби. В дослідженні брала

участь група холостого контролю, лікарським засобом для позитивного контролю був фторурацил. Досліджувані лікарські засоби були розділені на п'ять груп з різними концентраціями, які досліджувалися в трьох паралельних повтореннях. Культюри клітин вміщували до термостатного інкубатору з 5% CO₂ при температурі 37°C для культивування протягом 4 днів. Розчин культивування відкидали та додавали 100мкл розчину МТТ (0,4мг/мл, виготовлений в RPMI 1640) на яйцечку і продовжували культивування протягом 4 год при температурі 37°C. Супернатант відкидали та додавали 150мкл диметилсульфоксиду для розчинення гранул Formazan. Після обережного перемішування вимірювали значення оптичної густини за допомогою

приладу для мічення ферментів BIORAD 550 при довжині хвилі 540нм та довжині хвилі порівняння 450нм.

Результати

Дані інгібування клітин наносили на графік та будували криву залежності "доза-реакція", за якою обчислювали 50% інгібувальну концентрацію IC₅₀ (див. Таблицю 1 та Таблицю 2).

Результат (див. Таблицю 1) продемонстрував, що інтервали IC₅₀ чотирьох лікарських засобів (метил-ТМ3-8-карбоксилат, бутил-ТМ3-8-карбоксилат, н-гексил-ТМ3-8-карбоксилат та ТМ3 кислота) становили для вибраних штамів клітин 10~30мг/мл, причому не спостерігалось значних відмінностей між ними з точки зору дії на клітини.

Таблиця 1

Загибель пухлинних клітин (метод МТТ)

Штами клітин	IC ₅₀				
	Фторурацил	ТМ3 кислота	н-Гексил-ТМ3-8-карбоксилат	Метил-ТМ3-8-карбоксилат	Бутил-ТМ3-8-карбоксилат
MV3	0,427	14,625	8,835	8,827	7,568
MCF-7	0,629	14,911	19,995	17,665	16,558
Bel-7402	0,495	16,957	27,203	25,304	24,368
A549	0,126	>19,5	26,632	27,001	25,336
HCT-8	0,606	18,525	28,644	28,369	27,359
BGC-823	0,722	>19,5	>19,5	>19,5	>19,5

Вплив місцевого застосування гексил-ТМ3-8-карбоксилату на ріст ксенотрансплантованої меланоми людини у голих мишей МУЗ

Гексил-ТМ3-8-карбоксилат був вибраний як репрезентативна сполука для дослідження впливу похідних ТМ3-8-карбоксилату на ріст ксенотрансплантованої меланоми людини у голих мишей MV3.

Гексил-ТМ3-8-карбоксилат розчиняли в ДМСО з одержанням розчину 50мг/мл. Здійснювали ксенотрансплантацію меланоми людини голим мишам BALB/c-ну і дозволяли їй рости. Коли пухлина досягала об'єму 100~300мм³, всіх тварин поділяли на дві групи у відповідності до розміру пухлини, по 8 мишей в кожній групі.

З вказаних двох груп одна являла собою групу лікарського засобу, в якій здійснювали лікування нанесенням розчину гексил-ТМ3-8-карбоксилату; інша група служила контролем, де пухлини росли природним чином.

В групі лікарського засобу його застосовували шляхом нанесення в місці пухлини та навколишньої області (2см×2см) двічі на день (один раз в суботу та неділю). Кожного разу, коли розчин висихав, нанесення повторювали 1-2 рази. Середня добова доза введенного миші гексил-ТМ3-8-карбоксилату загалом становила приблизно 20мг.

Об'єм пухлини у миші вимірювали двічі на тиждень, таким чином, щоб спостерігати та реєструвати її ріст в динаміці. Коли пухлини в контрольній групі досягали визначеного об'єму, всі миші були забиті, пухлини були витягнуті та зважені, був обчислений ступінь інгібування росту. Проліферацію пухлини (Т/С(%)) обчислювали з використанням відносного об'єму пухлини в двох групах.

Об'єм пухлини (TV) обчислювали за наступним рівнянням:

$$\text{Довжина} \times \text{ширина}^2 \div 2$$

Відносний об'єм пухлини обчислювали за наступним рівнянням:

$$V_i/V_0$$

де V₀ являє собою TV, виміряний в точці часу, в якій тварин розподіляли в окремі клітини, та V_i являє собою TV, виміряний в подальшому в кожній точці часу.

t-тест застосовували для порівняння статистичної відмінності між двома групами для багатьох показників, таких як маса пухлини, TV та RTV. Відносну швидкість проліферації пухлини (Т/С(%)) застосовували як показник протипухлинної біологічної активності, яку обчислювали наступним чином:

$$T/C(\%) = \frac{\text{Група лікарського засобу (Т) RTV}}{\text{Контрольна група (С) RTV}} \times 100$$

Критерії оцінки ефекту:

Ефект оцінювали за допомогою статистичного аналізу. Ефект вважали недостовірним, якщо Т/С (%) становило більше 60, та вважали достовірним, якщо Т/С (%) становило ≤60 при p<0,05.

Результати показали, що гексил-ТМ3-8-карбоксилат здійснює виражену інгібувальну дію на ріст різних видів карциноми у мишей та виражений цитотоксичний вплив на клітини карциноми, такі як меланома людини MV3; при щоденному зовнішньому введенні мишам 20мг вказаного засобу виявляли виражений ефект інгібування пересаженої карциноми. В кінці експерименту, спостерігалася статистично значуща відмінність маси та об'єму пухлин в порівнянні з контрольною гру-

пою. Результати можна побачити на Фіг.1, 2 і в Таблиці 2. Фіг.1 демонструє вплив нанесення гексил-ТМЗ-8-карбоксилату на ріст різних видів меланоми людини, який можна побачити з даних росту меланоми людини в групі лікарського засобу, який помітно інгібувався в порівнянні з контрольною групою або групою негативною контролю. Фіг.2 демонструє реальне зображення мишей з

двох груп. У верхній частині зображення показані миші з контрольної групи, в нижній частині - миші з групи лікарського засобу. Верхня частина другої фотографії демонструє вигляд пухлин в контрольній групі, а нижня частина демонструє вигляд пухлин в групі лікарського засобу. В Таблиці 2 показано вплив нанесення гексил-ТМЗ-8-карбоксилату на ріст пухлин у мишей з MV3.

Таблиця 2

Вплив нанесення гексил-ТМЗ-8-карбоксилату на мишей з MV3 (20мг/добу/мишу)

Групи	Кількість мишей (п)		Маса тіла (г)		Об'єм пухлини (мм ³)		RTV	T/C (%)	Маса пухлини (г)	Інгібування (%)
	Початок випробування	Кінець випробування	Початок випробування	Кінець випробування	Початок випробування	Кінець випробування				
Група негативного контролю	8	8	22,6±1,56	24,8±0,535	106±56,3	2456±960,39	35±7,88		2,15±0,86	
Група гексил-ТМЗ-8-карбоксилату	8	8	24,0±1,48	25,6±3,64	115±36	635±545,1*	3,25±1,85	33,70	0,45±0,335	83,2

Примітка: * В порівнянні з контрольною групою, $P < 0,05$, маса тіла, маса пухлини та об'єм пухлини, виражені як $X \pm$ стандартне відхилення (SD).

Фіг.1 представляє криву росту пухлини, показуючи інгібувальний вплив н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату на ріст різних видів меланоми людини.

Фіг.2 представляє реальне зображення тіла миші з групи досліджуваного препарату та контрольної групи.

Фіг.3 демонструє результати вивчення стабільності н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату в широко застосовуваних спиртах.

Фіг.4 демонструє вплив значення pH середовища на стабільність н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату.

Наступні приклади ілюструють винахід без будь-якого обмеження його меж.

Приклад 1

Одержання ТМЗ кислоти (EP0252682)

При перемішуванні ТМЗ (2,577ммоль, 0,5г) змішують з концентрованою сірчаною кислотою (4 мл). Натрію нітрит (9,4ммоль, 0,65г) розчиняють в 2,6мл води і по краплях додають до описаної вище суміші на льодяній бані при температурі нижче 15°C, та перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. До одержаної суміші додають 10г льоду та охолоджують протягом 1 год на льодяній бані. Твердий продукт відокремлюють, та сушать під вакуумом з одержанням 0,493г ТМЗ кислоти. Вихід становить 98,6%.

Приклад 2

Одержання ТМЗ-8-карбоксилату

Суміш безводних ДМФА (2мл) та ТГФ (3мл) впорскують к колбу, заповнену ТМЗ кислотою (1ммоль, 0,195г), одержаною у відповідності до Прикладу 1, та Руброп (1ммоль, 0,466г) і перемішують до повного розчинення твердої речовини, до якої в умовах льодяної бані додають 4-диметиламінопіридин (DMAP, 2ммоль, 0,244г). Далі до одержаної суміші впорскують відповідну

кількість безводного вуглеводневого спирту або меркаптану 2,2 (ммоль) та продовжують реакцію протягом 30 хвилин, після чого перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Після завершення реакції суспензію фільтрують крізь лійку Бюхнера. Одержаний маточник піддають дистиляції; до залишку додають 10г льоду та екстрагують етилацетатом (10мл×3). Етилацетатні фракції об'єднують та сушать за допомогою безводного магнію сульфату. Етилацетат видаляють за допомогою роторного випарювання з одержанням залишку. Далі залишок очищують на колонці з силікагелем та одержують цільову сполуку після випарювання розчинників.

Продукт ідентифікований за допомогою ІЧ-спектра, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР та МС. Типові дані були такими, як показано нижче:

1. Метил-ТМЗ-8-карбоксилат

¹H ЯМР (d₆-ДМСО/проміле) δ 8,86 (с, 1, Н-6), 3,90 (с, 3, CH₃-O), 3,87 (с, 3, CH₃-N)

¹³C ЯМР (d₆-ДМСО/проміле) δ 161 (COO), 139 (C-4), 137 (C-6), 129 (C-9), 126 (C-8), 52,2 (OCH₂), 36,4 (NCH₃)

ν_{\max} (KBr): 3489, 2961 (C-H), 1752 (C=O), 1727 (C=O), 1214 (C-O), 1062 (C-O), 828, 556cm⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 232 [M+H]⁺, 214 [M+H₂O]⁺

2. Етил-ТМЗ-8-карбоксилат

¹H ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 8,45 (с, 1, Н-6), 4,52 (к, 2, J=7,1Гц, CH₂-O), 4,04 (с, 3, CH₃-N), 1,45 (т, 3, J=7,1Гц, CH₂-CH₃)

¹³C ЯМР (d₆-ДМСО/проміле) δ 161 (COO), 139 (C-4), 137 (C-6), 129 (C-9), 127 (C-8), 60,9 (OCH₂), 36,4 (NCH₃), 14,3 (CH₂CH₃)

ν_{\max} (KBr): 3478, 2991 (C-H), 1754 (C=O), 1700 (C=O), 1467 (C-O), 1258 (C-O), 1060 (C-O), 844, 561cm⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 246 [M+H]⁺, 228 [M+H-N₂O]⁺

3. Пропіл-ТМ3-8-карбоксилат

¹H ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 8,46 (с, 1, Н-6), 4,41 (т, 2, J=6,7Гц, CH₂-O), 4,03 (с, 3, CH₃-N), 1,83 (секстет, 2, J=7,1Гц, C-CH₂-C), 1,03 (т, 3, J=7,4Гц, C-CH₃)

¹³C ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 160 (COO), 138 (C-4), 136 (C-6), 130 (C-9), 128 (C-8), 67,1 (OCH₂), 36,5 (NCH₃), 21,7 (CH₂CH₃), 8,87 (CH₂CH₃)

ν_{\max} (KBr): 3122, 2960 (C-H), 1729 (C=O), 1700 (C=O), 1457 (C-O), 1200 (C-O), 1174 (C-O), 1052, 942 см⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 260 [M+H]⁺, 242 [M+H-N₂O]⁺

4. Бутил-ТМ3-8-карбоксилат

¹H ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 8,45 (с, 1 Н-6), 4,45 (т, 2, J=7,1Гц, C-CH₂-O), 4,03 (с, 3, CH₃-N), 1,79 (квінтет, 2, J=7,4Гц, C-CH₂-C), 1,46 (секстет, 2, J=7,3Гц, C-CH₂-CH₃), 0,95 (т, 3, J=7,3Гц, C-CH₃)

¹³C ЯМР (d₆-DMCO/проміле) δ 161 (COO), 139 (C-4), 137 (C-6), 129 (C-9), 127 (C-8), 64,5 (OCH₂), 36,4 (NCH₃), 30,3 (OCH₂CH₂), 18,7 (CH₂CH₃), 13,6 (CH₂CH₃)

ν_{\max} (KBr): 3156, 2967 (C-H), 1746 (C=O), 1467 (C-O), 1261 (C-O), 1054 (C-O), 823, 561 см⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 274 [M+H]⁺, 256 [M+H-N₂O]⁺

5. Аміл-ТМ3-8-карбоксилат

¹H ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 8,46 (с, 1, Н-6), 4,45 (т, 2, J=7,0Гц, CH₂-O), 4,03 (с, 3, CH₃-N), 1,79 (квінтет, 2, J=7,1Гц, C-CH₂-C), 1,29-1,40 (м, 4, C-(CH₂)₂-CH₃), 0,96 (т, 3, J=6,9Гц, C-CH₃)

¹³C ЯМР (d₆-DMCO/проміле) δ 161 (COO), 139 (C-4), 137 (C-6), 129 (C-9), 127 (C-8), 64,6 (OCH₂), 36,4 (NCH₃), 30,9 (OCH₂CH₂), 28,2 (O(CH₂)₂CH₂), 22,8 (CH₂CH₃), 14,0 (CH₂CH₃)

ν_{\max} (KBr): 3136, 2967 (C-H), 1736 (CO), 1459 (C-O), 1231 (C-O), 1154 (C-O), 923, 761 см⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 288 [M+H]⁺, 270 [M+H-N₂O]⁺

6. Гексил-ТМ3-8-карбоксилат

¹H ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 8,49 (с, 1, Н-6), 4,45 (т, 2, J=6,9Гц, CH₂-O), 4,04 (с, 3, CH₃-N), 1,79 (квінтет, 2, J=7,1Гц, C-CH₂-C), 1,29-1,40 (м, 6, C-(CH₂)₃-CH₃), 0,87 (т, 3, J=6,9Гц, C-CH₃)

¹³C ЯМР (d₆-DMCO/проміле) δ 161 (COO), 139 (C-4), 137 (C-6), 129 (C-9), 127 (C-8), 64,8 (OCH₂), 36,4 (NCH₃), 30,9 (OCH₂CH₂), 28,2 (O(CH₂)₂CH₂), 25,1 (CH₂CH₂CH₃), 22,1 (CH₂CH₃), 13,9 (CH₂CH₃)

ν_{\max} (KBr): 3156, 2967 (C-H), 1746 (C=O), 1467 (C-O), 1261 (C-O), 1054 (C-O), 823, 561 см⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 302 [M+H]⁺, 284 [M+H-N₂O]⁺

7. Гептил-ТМ3-8-карбоксилат

¹H ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 8,39 (с, 1, Н-6), 4,38 (с, 2, C-CH₂-O), 4,00 (с, 3, CH₃-N), 1,75 (с, 2, C-CH₂-C), 1,19 (с, 8, C'-CH'-C), 0,83 (с, 3, C-CH₃)

¹³C ЯМР (аб-DMCO/проміле) δ 161 (COO), 139 (C-4), 137 (C-6), 129 (C-9), 127 (C-8), 64,8 (OCH₂),

36,4 (NCH₃), 31,1 (OCH₂CH₂), 2 х 28,4 (OCH₂CH₂(CH₂)₂), 25,3 (CH₂CH₂CH₃), 22,1 (CH₂CH₃), 13,8 (CH₂CH₃)

ν_{\max} (KBr): 3146, 2927 (C-H), 2858 (C-H), 1748 (C=O), 1718 (C=O), 1457 (C-O), 1245 (C-O), 828, 566 см⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 316 [M+H]⁺, 398 [M+H-N₂O]⁺

8. Октил-ТМ3-8-карбоксилат

¹H ЯМР (CDCl₃/проміле) δ 8,36 (с, 1, Н-6), 4,36 (с, 2, CH₂-O), 3,95 (с, 3, CH₃-N), 1,74 (с, 2, C-CH₂-C), 1,19 (с, 10, C-(CH₂)₅-C), 0,78 (с, 3, C-CH₃)

¹³C ЯМР (d₆-DMCO/проміле) δ 160 (COO), 139 (C-4), 137 (C-6), 129 (C-9), 127 (C-8), 64,8 (OCH₂), 36,4 (NCH₃), 31,2 (OCH₂CH₂), 2 х 28,6 (OCH₂CH₂(CH₂)₂), 28,2 (O(CH₂)₄CH₂), 25,4 (CH₂CH₂CH₃), 22,1 (CH₂CH₃), 13,9 (CH₂CH₃)

ν_{\max} (KBr): 2925, 2853, 1758, 1720, 1467, 1255, 838, 556 см⁻¹

МС: + іонізація електророзпиленням (співвідношення маси до заряду) = 330 [M+H]⁺, 312 [M+H-N₂O]⁺

Приклад 3

Дослідження стабільності похідних ТМ3-8-карбоксилату в спиртах

Точну наважку н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату розбавляють, відповідно, метанолом, етанолом, ізопропанолом та трет-бутиловим спиртом, щоб одержати 1% розчин. По три зразка розчинів (20мл) відбирають з кожного із описаних вище розчинів та вміщують до пляшки коричневого скла об'ємом 50 мл, закупорюють та залишають стояти при кімнатній температурі. В точках часу 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 місяців після початку експерименту відбирають зразки досліджуваних розчинів та визначають концентрацію н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату за допомогою ВЕРХ для обчислення середнього значення трьох паралельних визначень та побудови графіку. Одержані результати продемонстрували, що н-гексил-ТМ3-8-карбоксилат швидко розкладається в метанолі та етанолі, тоді як в ізопропанолі та трет-бутиловому спирті він залишається стабільним. Див. Фіг.3.

Приклад 4

Дослідження стабільності ТМ3-8-карбоксилату в кислому середовищі

Точні наважки натрію гідроксиду та лимонної кислоти розбавляють водою з одержанням розчинів, які мають значення рН 7,5, 7,0, 6,5, 6,0 та 5,5, відповідно. Точну наважку н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату розчиняють у вказаних водних розчинах з різним значеннями рН з утворенням серії 1% розчинів к-гексил-ТМ3-8-карбоксилату. Три зразки розчину (по 20мл) відбирають з кожного з описаних вище розчинів та вміщують в мірні пляшки коричневого скла об'ємом 50мл, закупорюють та залишають стояти при кімнатній температурі. Через 1,4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 місяці після початку експерименту відбирають зразки досліджуваних розчинів та визначають концентрацію н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату за допомогою ВЕРХ, для обчислення середнього значення трьох паралельних визначень та побудови графіку. Одержані

результати продемонстрували, що н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилат швидко розкладається у слабко лужному (pH 7,5) або нейтральному (pH 7,0) середовищі, тоді як в кислому (pH<7,0) середовищі він залишається відносно стабільним. Див. Фіг.4.

Приклад 5

Одержання системи типу резервуару твердої речовини метил-ТМЗ-8-карбоксилату

Наважку 3г метил-ТМЗ-8-карбоксилату подрібнюють до стану тонкого порошку та змішують з 20г води, 50г олеїнової кислоти, 30г ВЕ ТПГС та відповідною кількістю лимонної кислоти, одержуючи мікроемульсію шляхом помелу. Додають відповідну кількість мембрани, що сповільнює швидкість вивільнення (співполімер етилену та вінілацетату) та PSAs (чутлива до тиску полісилоксанова смола). Одержану суміш ретельно перемішують, дегазують шляхом збереження тепла з використанням водяної бані, та розподіляють на полімерній матриці. Висушують та розрізають на 50 пластирів з одержанням цільового продукту.

Приклад 6

Одержання системи типу резервуару твердої речовини пропіл-ТМЗ-8-карбоксилату

Спосіб виготовлення вказаної системи описаний в Прикладі 5 з одержанням 50 шматків пластиру, де метил-ТМЗ-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на пропіл-ТМЗ-8-карбоксилат.

Приклад 7

Одержання системи типу резервуару твердої речовини бутил-ТМЗ-8-карбоксилату

Спосіб виготовлення вказаної системи описаний в Прикладі 5 з одержанням 50 шматків пластиру, де метил-ТМЗ-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на бутил-ТМЗ-8-карбоксилат.

Приклад 8

Одержання системи типу резервуару твердої речовини гептил-ТМЗ-8-карбоксилату

Спосіб виготовлення вказаної системи описаний в Прикладі 5 з одержанням 50 шматків пластиру, де метил-ТМЗ-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на гептил-ТМЗ-8-карбоксилат.

Приклад 9

Одержання системи типу резервуару твердої речовини н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату

Спосіб виготовлення вказаної системи описаний в Прикладі 5 з одержанням 50 шматків пластиру, де метил-ТМЗ-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилат.

Приклад 10

Одержання системи типу резервуару твердої речовини етил-ТМЗ-8-карбоксилату

Спосіб виготовлення вказаної системи описаний в Прикладі 5 з одержанням 50 шматків пластиру, де метил-ТМЗ-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на етил-ТМЗ-8-карбоксилат.

Приклад 11

Одержання пластиру аміл-ТМЗ-8-карбоксилату

Спосіб виготовлення вказаної системи описаний в Прикладі 5 з одержанням 50 шматків пласт-

тиру, де метил-ТМЗ-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на аміл-ТМЗ-8-карбоксилат.

Приклад 12

Одержання капсули бутил-ТМЗ-8-карбоксилату

Наважку 5мг бутил-ТМЗ-8-карбоксилату мелють до стану тонкого порошку та наповнюють одержаним порошком тверду желатинову капсулу з одержанням препарату в капсулах.

Приклад 13

Одержання капсули гептил-ТМЗ-8-карбоксилату

Наважку 10мг гептил-ТМЗ-8-карбоксилату мелють до стану тонкого порошку та наповнюють одержаним порошком тверду желатинову капсулу з одержанням препарату в капсулах

Приклад 14. Одержання капсули октил-ТМЗ-8-карбоксилату

Наважку 10мг октил-ТМЗ-8-карбоксилату мелють до стану тонкого порошку та наповнюють одержаним порошком тверду желатинову капсулу з одержанням препарату в капсулах.

Приклад 15

Одержання капсули н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату

Рецептура

н-Гексил-ТМЗ-8-карбоксилат	10мг
Лактоза	65мг
Прежелатинізований крохмаль	25мг
Натрій кроскармелоза	3мг
Колоїдний кремнію діоксид	0,25мг
Стеарат магнію	0,30мг.

н-Гексил-ТМЗ-8-карбоксилат, лактозу, прежелатинізований крохмаль, натрій кроскармелозу (поперечно-зшита натрій карбоксиметилцелюлоза) відповідно просіюють крізь сито 65 меш для подальшого використання. Наважку н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилату у відповідності до вказаної в рецептурі кількості змішують з іншими допоміжними речовинами методом пропорційного збільшення кількостей. Суміш тричі просіюють крізь сито 65 меш. Виміряне значення кута природного укусу становило менше 30°. Після проведення аналізу вмісту та визначення місткості одержують капсули, вміщуючи суміш у капсули №3.

Приклад 16

Одержання капсули октил-ТМЗ-8-карбоксилату

Рецептура

Октил-ТМЗ-8-карбоксилат	10мг
Лактоза	65мг
Прежелатинізований крохмаль	25мг
Натрій кроскармелоза	3мг
Колоїдний кремнію діоксид	0,25мг
Стеарат магнію	0,30мг.

Спосіб виготовлення описаний в Прикладі 14, за винятком того, що н-гексил-ТМЗ-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на октил-ТМЗ-8-карбоксилат. Одержують цільову капсулу.

Приклад 17

Одержання капсули 3-метил-гептил-ТМЗ-8-карбоксилату

Рецептура

3-Метил-гептил-ТМ3-8-карбоксилат	10мг
Лактоза	65мг
Прежелатинізований крохмаль	25мг
Натрій кроскармелоза	3мг
Колоїдний кремнію діоксид	0,25мг
Стеарат магнію	0,30мг.

Спосіб виготовлення описаний в Прикладі 14, за винятком того, що н-гексил-ТМ3-8-карбоксилат, як активний інгредієнт, замінений на 3-метил-гептил-ТМ3-8-карбоксилат. Одержують цільову капсулу.

Приклад 18

Одержання пластиру 2-етил-аміл-ТМ3-8-карбоксилату

Рецептура

2-Етил-аміл ТМ3-8-карбоксилат	3г
Вода	20г
Олеїнова кислота	50г
ВЕ ТПГС	30г

Лимонна кислота відповідна кількість.

Субстанції з наведеного вище переліку ретельно перемішують з одержанням мікроемульсії, до якої додають відповідну кількість мембрани, що сповільнює швидкість вивільнення (співполімер етилену та вінілацетату) та додають PSAs (чутлива до тиску полісилоксанова смола). Одержану суміш ретельно перемішують, дегазують шляхом збереження тепла з використанням водяної бані, та розподіляють на полімерній матриці. Висушують та розрізають на 50 пластирів з одержанням цільового продукту.

Приклад 19

Одержання трансдермальної емульсії н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату для місцевого застосування

Наважку 3г н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату подібноють до стану тонкого порошку та змішують з 20г води, 50г олеїнової кислоти, 30г фосфоліпиду, відповідною кількістю лимонної кислоти або сорбінової кислоти (рН 5,5), вітаміну Е та ізопропанолу для одержання мікроемульсії. Вона може бути використана безпосередньо або розділена на 50 частин для виготовлення 25 пластирів.

Приклад 20

Одержання трансдермальної емульсії н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату для місцевого застосування

Наважку 3г н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату подібноють до стану тонкого порошку та змішують з 20г води, 35г ВЕ ТПГС, 45г тригліцеридів з помірним або довгим ланцюгом, відповідною кількістю молочної кислоти або бензойної кислоти (рН 5,0) та ізопропанолу для одержання мікроемульсії. Вона може бути використана безпосередньо або розділена на 50 частин для виготовлення 25 пластирів.

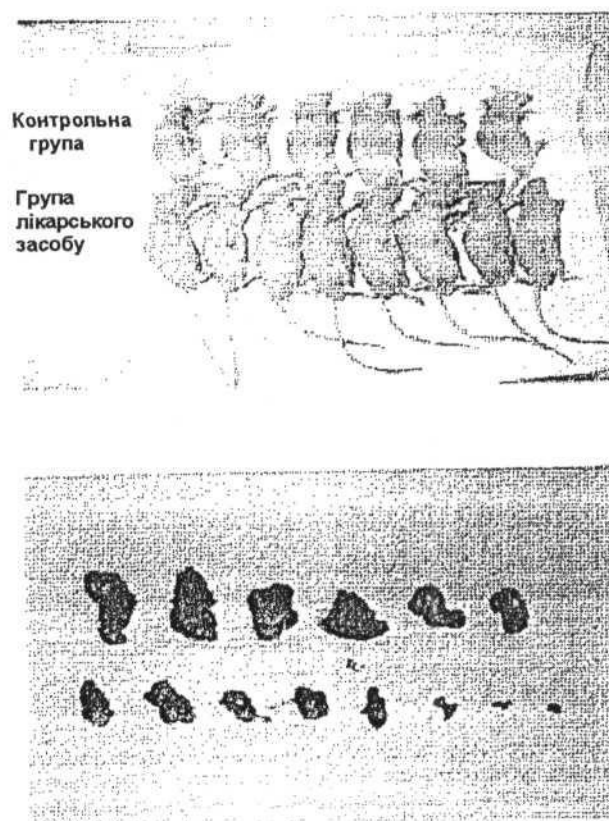
Приклад 21

Одержання трансдермальної мазі к-гексил-ТМ3-8-карбоксилату для місцевого застосування

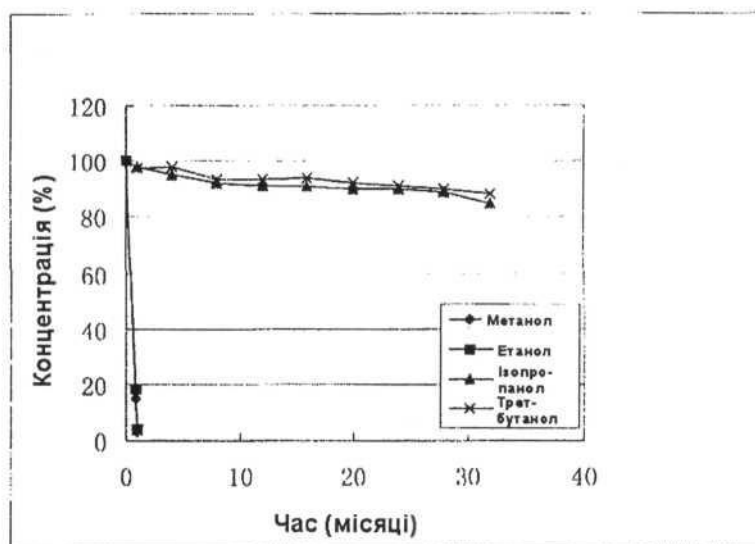
Наважку 3г н-гексил-ТМ3-8-карбоксилату подібноють до стану тонкого порошку та змішують з 15г води, 50г ВЕ ТПГС, 35г ізопропілміристату, відповідною кількістю яблучної кислоти або бензойної кислоти (рН 6,0) та ізобутилового спирту для одержання мазі. Вона може бути використана безпосередньо або може бути перетворена на мікроемульсію та розділена на 50 частин для виготовлення 25 пластирів.



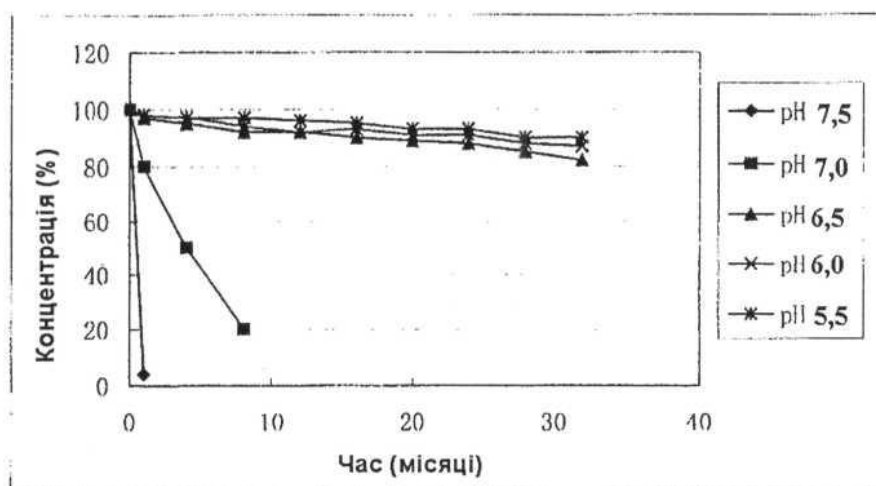
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4