



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94580 (13) C2

(51) МПК (2011.01)  
A61K 31/436 (2006.01)  
A61P 25/00  
A61P 25/28 (2006.01)  
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНАЛОГ 39-ДЕЗМЕТОКСИРАПАМІЦИНУ, ЗДАТНИЙ ДОЛАТИ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНИЙ БАР'ЄР, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПАТОЛОГІЧНОГО СТАНУ, ВИКЛИКАНОГО НЕЙРОГЕННИМ ПОШКОДЖЕННЯМ АБО ЗАХВОРЮВАННЯМ

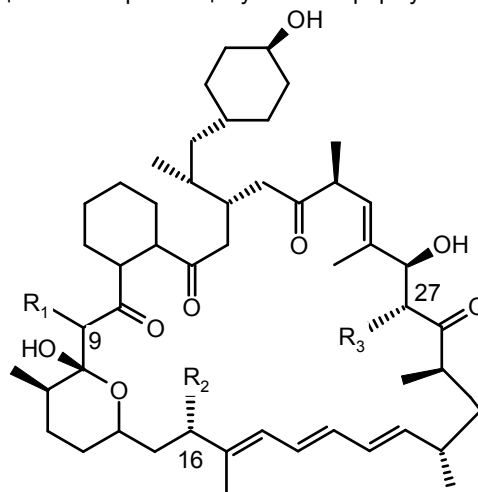
1

(21) a200711241  
(22) 10.03.2006  
(24) 25.05.2011  
(86) PCT/GB2006/000834, 10.03.2006  
(31) 0504995.2  
(32) 11.03.2005  
(33) GB  
(31) 11/097,605  
(32) 01.04.2005  
(33) US  
(31) 0522829.1  
(32) 09.11.2005  
(33) GB  
(46) 25.05.2011, Бюл.№ 10, 2011 р.  
(72) ШЕРІДАН РОЗА МЕРІ, GB, ЖАНГ МІНГКЬЯНГ, NL/GB, ГРЕГОРІ МЕТЬЮ АЛАН, GB  
(73) БІОТИКА ТЕКНОЛОДЖІ ЛІМІТЕД, GB  
(56) WO 2004/007709 A, 22.01.2004  
WO 2006/016167 A2, 16.02.2006  
LOWDEN PHILIP A S ET AL: "New rapamycin derivatives by precursor-directed biosynthesis." CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY. 2 APR 2004, vol. 5, no. 4, 2 April 2004 (2004-04-02), pages 535-538  
GREGORY M A ET AL: "566 Novel mTOR inhibitors with improved pharmacological properties over rapamycin" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 2, no. 8, September 2004 (2004-09), page 172  
HAMILTON G S ET AL: "NEUROIMMUNOPHILIN LIGANDS AS NOVEL THERAPEUTICS FOR THE TREATMENT OF DEGENERATIVE DISORDERS OF THE NERVOUS SYSTEM" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 3, no. 4, 1997, pages 405-428  
GREGORY MATTHEW A ET AL: "Mutasythesis of rapamycin analogues through the manipulation of a

2

gene governing starter unit biosynthesis." ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH) 25 JUL 2005, vol. 44, no. 30, 25 July 2005 (2005-07-25), pages 4757-4760

(57) 1. Агент, який є сполукою-аналогом 39-дезметоксирапаміцину формули (I),



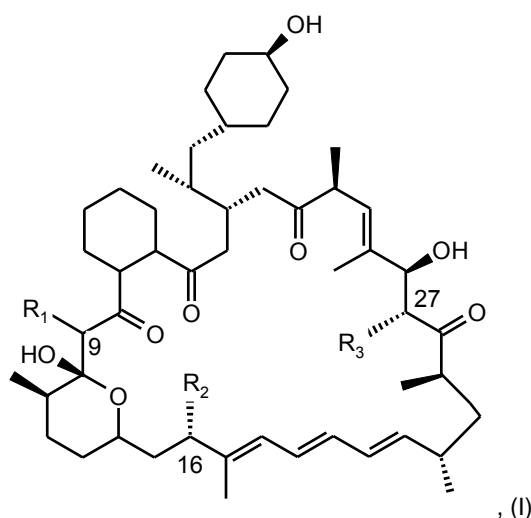
де R<sub>1</sub> представлений (H, H) або = O, а R<sub>2</sub> та R<sub>3</sub> кожний незалежно представлені H, OH або OCH<sub>3</sub>, або його фармацевтично прийнятна сіль, здатні долати гематоенцефалічний бар'єр, для лікування патологічного стану, який є наслідком нейрогенного пошкодження або захворювання, і/або лікування пухлин або В-клітинних новоутворень, де пухлина або В-клітинне новоутворення є резистентним до одного або більше існуючих протипухлинних агентів.

2. Застосування агента, який є аналогом 39-дезметоксирапаміцину формули (I),

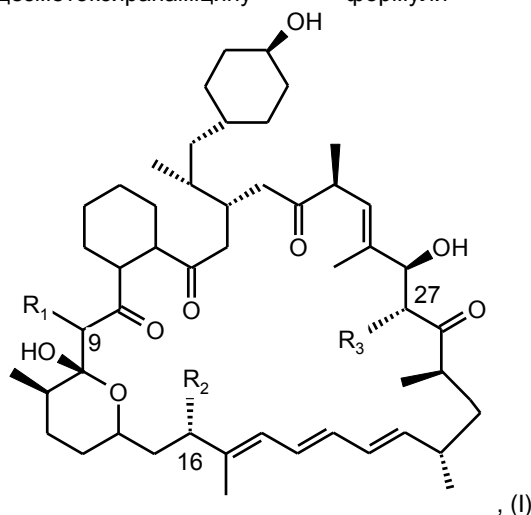
(13) C2

(11) 94580

(19) UA



де  $R_1$  представлений (H, H) або = O, а  $R_2$  та  $R_3$  кожний незалежно представлені H, OH або  $OCH_3$ , або його фармацевтично прийнятної солі для лікування патологічного стану, який є результатом нейрогенного ушкодження або захворювання.  
3. Застосування агента, який є аналогом 39-дезметоксирапаміцину формули (I),



де  $R_1$  представлений (H, H) або = O, а  $R_2$  та  $R_3$  кожний незалежно представлені H, OH або  $OCH_3$ , для приготування медикаменту для лікування патологічного стану, який зачіпає центральну нервову систему, коли патологічний стан вимагає медикаменту, який проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр.

4. Агент за п. 1 або 2, або 3, який **відрізняється** тим, що патологічний стан вибраний із групи, яка складається з пухлини(ин) головного мозку та нейродегенеративних станів.

5. Агент за п. 4, який **відрізняється** тим, що медикамент призначений для лікування пухлин головного мозку.

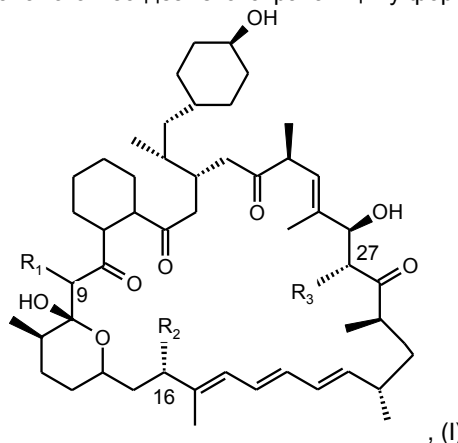
6. Агент за п. 5, який **відрізняється** тим, що пухлиною головного мозку є мультиформна гліобlastома.

7. Агент за п. 4, який **відрізняється** тим, що медикамент призначений для лікування нейродегенеративних станів.

8. Агент за п. 7, який **відрізняється** тим, що нейродегенеративним станом є хвороба Альцгеймера,

9. Агент за п. 7, який **відрізняється** тим, що нейродегенеративним станом є розсіяний склероз.

10. Застосування агента за п. 1, який є сполукою-аналогом 39-дезметоксирапаміцину формули (I),



де  $R_1$  представлений (H, H) або = O, а  $R_2$  та  $R_3$  кожний незалежно представлені H, OH або  $OCH_3$ , або його фармацевтично прийнятної солі у приготуванні медикаменту для лікування пухлин або В-клітинних новоутворень, де пухлина або В-клітинне новоутворення є резистентним до одного або більше існуючих протипухлинних агентів.

11. Застосування за п. 10, яке **відрізняється** тим, що пухлина або В-клітинне новоутворення експресують Р-глікопротеїн.

12. Застосування за п. 11, яке **відрізняється** тим, що пухлина або В-клітинне новоутворення мають високий рівень експресії Р-глікопротеїну.

13. Агент за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що медикамент призначений для введення аналога 39-дезметоксирапаміцину або його фармацевтично прийнятної солі внутрішньовенно.

14. Агент за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що медикамент додатково включає один або більше інших терапевтичних агентів.

15. Агент за будь-яким з п. 1 або пп. 2-6, або 10-14, який **відрізняється** тим, що медикамент призначений для лікування пухлин або В-клітинних новоутворень і де медикамент додатково включає один або більше агентів, вибраних із групи, яка складається з метотрексату, лейковорину, адриаміцину, пренізону, блеоміцину, циклофосфаміду, 5-фторурацилу, паклітакселю, доцетакселю, вінкристину, вінбластину, вінорельбіну, доксорубіцину, тамоксифену, тореміфену, мегестрол-ацетату, анастрозолу, гoserеліну, анти-HER2 моноклональних антитіл (Герцептину™), капецитабіну, ралоксифен-гідрохлориду, інгібіторів рецептора епідермального фактора росту, інгібіторів фактора росту васкулярного ендотелію, інгібіторів протеасом та інгібіторів hsp90.

16. Агент за будь-яким з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин.

17. Агент за будь-яким з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що аналог 39-дезметоксирапаміцину

додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положеннями 9, 16 або 27.

18. Агент за п. 17, який **відрізняється** тим, що аналог 39-дезметоксирапаміцину додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положеннями 16 або 27.

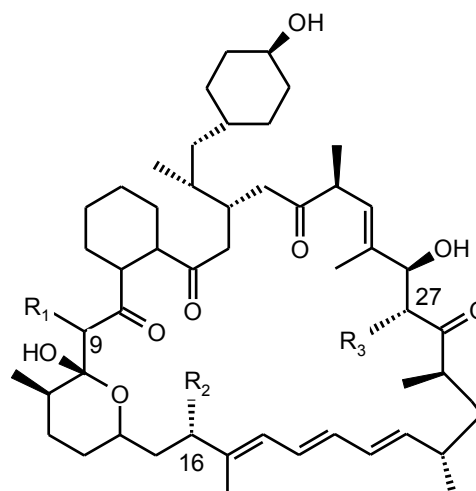
19. Агент за п. 16, який **відрізняється** тим, що аналог 39-дезметоксирапаміцину додатково відрізняється від рапаміцину за положеннями 16 та 27.

20. Агент за будь-яким з пп. 17-19, який **відрізняється** тим, що аналог 39-дезметоксирапаміцину має гідроксильну групу в положенні 27, тобто R<sub>3</sub> представлений OH.

21. Агент за будь-яким з пп. 17-19, який **відрізняється** тим, що аналог 39-дезметоксирапаміцину має водень у положенні 27, тобто R<sub>3</sub> представлений OH.

22. Агент за будь-яким з пп. 16-20, який **відрізняється** тим, що аналог 39-дезметоксирапаміцину має гідроксильну групу в положенні 16, тобто R<sub>2</sub> представлений OH.

23. Фармацевтична композиція, яка включає аналог 39-дезметоксирапаміцину формули (I),



де R<sub>1</sub> представлений (H, H) або = O, а R<sub>2</sub> та R<sub>3</sub> кожний незалежно представлені H, OH або OCH<sub>3</sub>, або його фармацевтично прийнятним сіль разом з фармацевтично прийнятним носієм.

24. Фармацевтична композиція за п. 23, яка **відрізняється** тим, що спеціально розроблена для внутрішньовенного застосування.

Даний винахід стосується медичного застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину.

Рапаміцин (сиролімус) (Фіг.1) є ліпофільним макролідом, який продукується *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 54 91 (Sehgal et al., 1975; US 3 929 992; US 3 993 749) з 1,2,3-трикарбонільною частиною компонента, зв'язаною з лактоном піпеколієвої кислоти (Piva et al., 1991). З огляду на мету даного винаходу нумерація атомів виконана у рапаміцині за McAlpin et al. (1991), на противагу нумерації за Findlay et al. (1980) або Chemical Abstracts (11-й Кумулятивний індекс, 1982-1986 p60719CS).

Рапаміцин має значну терапевтичну цінність завдяки широкому спектру біологічної активності (Huang et al., 2003). Сполуки за винаходом є потужними інгібіторами мішені рапаміцину у ссавців (mTOR) - серин-треонін кіназного шляху фосфатидил-інозитол-3-кіназного (P13K)/Akt (протеїн-кіназа B) сигнального каскаду, який визначає виживання та проліферацію клітин. Інгібуюча активність досягається після того, як рапаміцин зв'язується з імуніфілін-FK 506-зв'язуючим протеїном 12 (FKBP12) (Dumont, F.J. and Q.X. Su, 1995). У Т-клітинах рапаміцин інгібує передачу сигналів від ІЛ-2 рецептора і наступну аутопроліферацію Т-клітин, приводячи до імуносупресії. Рапаміцин продається як імуносупресант для лікування пацієнтів після трансплантації органів для запобігання відторгнення трансплантата (Huang et al., 2003). Крім імуносупресії, рапаміцин має терапевтичний потенціал при лікуванні ряду захворювань, наприклад онкологічних захворювань; серцево-судинних захворювань, таких як рестеноз; аутоімунних захворювань, таких

як розсіяний склероз, ревматоїдний артрит; грибкових інфекцій та нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та хвороба Гентінгтона.

Незважаючи на свою корисність при ряді патологічних станів, рапаміцин має ряд недоліків. По-перше, він є субстратом викачуючої помпи на клітинній мембрані - Р-глікопротеїну (P-gp, LaPante et al., 2002, Crowe et al., 1999), яка виводить сполуки із клітини, погіршуючи проникнення рапаміцину крізь клітинну мембрану. Це спричиняє погану абсорбцію сполуки після прийому ліків. Крім того, оскільки головним механізмом множинної фармацевтичної резистентності пухлинних клітин є ця помпа клітинної мембрани, рапаміцин менш ефективний проти пухлинних клітин, які проявляють мульти-фармацевтичну резистентність (МФР). По-друге, рапаміцин значною мірою метаболізується ферментами родини цитохрома Р450 (Lampen et al., 1998). Його втрата при первинному проходженні через печінку висока, що також вносить вклад у його низьку оральну біодоступність. Роль CYP3A4 та Р-gp у низькій біодоступності рапаміцину була підтверджена в дослідженнях, які продемонстрували, що застосування інгібіторів CYP3A4 та/або Р-gp знижує виведення рапаміцину з CYP3A4-трансформованих клітин лінії Caco-2 (Cummins et al., 2004), і що застосування інгібіторів CYP3A4 знижує метаболізм рапаміцину в тонкому кишківнику (Lampen et al., 1998). Низька оральна біодоступність рапаміцину викликає значну міжіндивідуальну варіабельність, яка призводить до неспроможності терапевтичного результату і важ-

кості клінічного менеджменту (Kuhn et al., 2001, Crowe et al., 1999).

Таким чином, існує необхідність розробки нових рапаміцин-подібних сполук, які не є субстратом P-гр, та які можуть бути метаболічно більш стабільними і таким чином, можуть мати покращену біодоступність. При використанні як протипухлинних агентів ці сполуки можуть мати більшу ефективність проти МФР-пухлинних клітин, зокрема, проти P-гр-експресуючих пухлинних клітин.

Повідомлялося про ряд синтезованих аналогів рапаміцину, які використовують хімічно доступні ділянки молекули. Опис таких сполук був пристосований до системи нумерації молекул рапаміцину, описаної на Фіг. 1. Хімічно доступні ділянки молекули для дериватизації або заміщення включають C40 та C28 гідроксильні групи (наприклад, US 5 665 772; US 5 362 718), C39 і C16 метоксигрупи (наприклад, WO96/41807; US 5 728 7100, C32, C26 та C9 кето-групи (наприклад, US 5 378 836; US 5 138 051; US 5 665 7720). Гідрогенування в ділянках C17, C19 та/або C21, спрямоване на триєн, призводить до збереження протигрибкової активності, але відносного зниження імуносупресії (наприклад, US 5391730; US 5023262). Значного підвищення стабільності молекули (наприклад, утворення оксимів у ділянках C32, C40 та/або C28, US 5536145, US 5446048), стійкості до метаболічної атаки (наприклад, US 5912253), біодоступності (наприклад, US 5221670; US 5955457; WO 98/04279) і продукції проліків (наприклад, US 6015815; US 5432183) було досягнуто шляхом дериватизації.

Двома найбільш успішними похідними рапаміцину в клінічній розробці є 40-O-(2-гідрокси)етил-рапаміцин (RAD001, Цертикан, еверолімус) - напівсинтетичний аналог рапаміцину, який демонструє імуносупресивний фармакологічний ефект (Sedrani, R. et al., 1998; Kircher et al., 2000; US 5665772) та 40-O-[2,2-біс(гідроксиметил)пропіонілокси]рапаміцин, CCI-779 (Wyeth-Ayerst) - ефір рапаміцину, який пригнічує клітинний ріст *in vitro* та інгібує ріст пухлини *in vivo* (Yu et al., 2001). CCI-779 на даний час проходить різні клінічні випробування як потенційний протипухлинний засіб. Недавні публікації про II фазу клінічних випробувань CCI-779 у пацієнтів з рекурентною мультиформною гліобластомою (Chang, et al., 2005) дозволили припустити, що низька ефективність цих ліків у пацієнтів може бути обумовлена їх поганим проникненням крізь гематоенцефалічний бар'єр. Дослідження фармакокінетики RAD001 показали, що як і рапаміцин, він є субстратом для P-гр (Crowe et al., 1999; Laplante et al., 2002).

Незважаючи на тісну структурну подібність до рапаміцину, сполуки даного винаходу проявляють цілком відмінний фармакологічний профіль. Зокрема, вони демонструють значно збільшену проникність крізь клітинну мембрану та зниження виходу в порівнянні з рапаміцином, і вони не є субстратом P-гр. Крім того, 39-дезметоксирапаміцин демонструє потужнішу активність проти множинної фармакологічної резистентності та P-гр-експресуючих пухлинних клітинних

ліній, ніж рапаміцин. При порівнянні з рапаміцином 39-дезметоксирапаміцин показує інгібіторний профіль, який значно відрізняється від панелей NCI 60 клітинних ліній.

Крім того, аналоги 39-дезметоксирапаміцину показують фармакокінетичний профіль, який значно відрізняється у порівнянні з рапаміцином та його провідними похідними в клінічних випробуваннях. Аналоги 39-дезметоксирапаміцину показують несподівано збільшену здатність перетинати гематоенцефалічний бар'єр і таким чином, демонструють поліпшену доступність для мозку.

Таким чином, даний винахід стосується медичного застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину, ці аналоги рапаміцину мають значно змінену фармакокінетику, поліпшену здатність до проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр, поліпшену метаболічну стабільність, поліпшену проникність крізь клітинні мембрани, знижену швидкість виходу та профіль інгібування пухлинних клітин, який відрізняється від такого у рапаміцину. Ці сполуки можуть бути застосовані в медицині, зокрема для лікування пухлин та/або В-клітинних новоутворень, для індукції або підтримки імуносупресії, стимуляції нейронної регенерації або лікування грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, реакції «трансплантат проти хазяїна», аутоімунних захворювань, запальних захворювань судин та фіброзних захворювань. Даний винахід зокрема стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин та/або В-клітинних новоутворень.

Було показано, що рапаміцин стимулює аутофагію (Raught et al., 2001). Порушення аутофагії або розлад регуляції аутофагії утягується в ряд захворювань, включаючи хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, хворобу Гентінгтона та пріонні захворювання (включаючи хворобу Крейтцфельда-Якоба), дозволяючи припустити, що маніпуляція цим шляхом може принести користь при лікуванні даних захворювань. Недавні дослідження *in vitro* продемонстрували, що застосування рапаміцину здатне знизити появу агрегатів і клітинну загибель, пов'язані з полі(Q) і полі(A) експансією в трансформованих COS-7 клітинах. (Ravikumar et al., 2002). Таким чином, якщо рапаміцин був здатний перетинати гематоенцефалічний бар'єр, ці результати показують, що він може бути придатним кандидатом для лікування хвороби Гентінгтона та інших подібних хвороб. Це дозволяє припустити, що існує необхідність розробки аналогів рапаміцину, які здатні перетинати гематоенцефалічний бар'єр.

Гіперфорсфорилювання пов'язаного з мікротубулами тау-протеїну та його наступна агрегація в нерозчинні спарені гелікальні філаменти, які формують внутрішньоклітинні «клубки», є однією з характерних ознак хвороби Альцгеймера, і нагромадження цієї нейрофібрилярної патології та пов'язана з цим загибель нейронних клітин тісно пов'язані з когнітивним погіршенням. Недавні дослідження An et al.(2003) показали, що активована p70 S6 кіназа спільно розподіляється з нейрофібрилярною патологією в мозку при хворобі Альцгеймера, і зокрема, активована p70 S6 кіназа

явно підвищена в нейронах перед розвитком клубків (An et al., 2003). При аналізі *in vitro*, де застосування сульфату цинку призводило до активації p70 S6 кінази та підвищувало рівень загального, нормального і гіперфосфорильованого тау, було показано, що попередня обробка клітин рапаміцином знижувала активацію p70 S6 кінази в три рази і значно зменшувала рівень загального, нормального та гіперфосфорильованого тау. Таким чином, дані результати показують, що застосування аналогів рапаміцину може бути корисним для зниження нейрофібрилярної патології при хворобі Альцгеймера, пропонуючи сполуки, здатні досягати місця дії.

Крім того, повідомлялося, що рапаміцин підвищує розростання нейритів та нейронне виживання в деяких *in vitro* і *in vivo* моделях (Avramut and Achim, 2002), що свідчить про те, що рапаміцин і аналоги, таким чином, можуть бути використані для лікування захворювань, при яких нейронна регенерація може приносити значну терапевтичну користь. Однак ця користь залежить від здатності досягати місця дії, і в такий спосіб аналоги рапаміцину з поліпшеною здатністю до перетинання гематоенцефалічного бар'єра можуть бути особливо бажаними.

Даний винахід стосується нового та незвичайного застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину в медицині, зокрема до використання 39-дезметоксирапаміцину, зокрема при лікуванні пухлин або В-клітинних новоутворень, для індукції або підтримки імуносупресії, стимуляції нейронної регенерації або лікування грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, хвороби «трансплантат проти хазяїна», аутоімунних захворювань, нейродегенеративних станів, запальних захворювань судин і фіброзних захворювань. Зокрема даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин та В-клітинних новоутворень. У кращому втіленні даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування неврологічних і нейродегенеративних станів. Зокрема в кращому втіленні даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин головного мозку, зокрема мультиформної гліобластоми. У конкретному аспекті даного винаходу аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин.

Даний винахід стосується медичного застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину, зокрема 39-дезметоксирапаміцину, зокрема для лікування пухлин та/або В-клітинних новоутворень, індукції або підтримки імуносупресії, лікування відторгнення трансплантата, хвороби «трансплантат проти хазяїна», аутоімунних захворювань, нейродегенеративних станів, запальних захворювань судин та фіброзних захворювань, стимуляції нейронної регенерації або лікування грибкових інфекцій. Зокрема даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин та В-клітинних новоутворень. У конкретному втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин та

В-клітинних новоутворень. Даний винахід також особливо стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин мозку або нейродегенеративних станів. У конкретному втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин мозку або нейродегенеративних станів. Даний винахід також конкретно стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування нейродегенеративних станів. Зокрема даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування нейродегенеративних станів.

Визначення

Термін «аутоімунне(і) Захворювання(ня)» включає без обмеження: системний червоний вовчак (СЧВ), ревматоїдний артрит, міастенію гравіс і розсіяний склероз.

Термін «запальні захворювання» включає без обмеження: псоріаз, дерматит, екзему, себорею, запальні захворювання кишковика (включаючи, але не обмежуючись виразковим колітом і хворобою Крона), запальні захворювання легенів (включаючи астму, хронічне обструктивне захворювання легенів, емфізему, гострий респіраторний дистрес-синдром та бронхіт), ревматоїдний артрит і увеїт.

Термін «пухлина» відноситься до пухлин або доброякісного росту клітин у шкірі або органах тіла, наприклад але без обмеження, у молочній залозі, простаті, легенях, нирках, підшлунковій залозі, головному мозку, шлунку або кишківнику. Злаякісна пухлина має тенденцію інфільтрувати суміжні тканини та поширюватися (метастазувати) у віддалені органи, наприклад, кістки, печінку, легені або головний мозок. Термін «пухлина» включає всі метастатичні типи пухлинних клітин, такі як, але без обмежень, меланома, лімфома, лейкемія, фібросаркома, рабдіоміосаркома, та мастоцитомі і типи тканинної карциноми, такої як, але без обмеження, колоректальний рак, рак простати, дрібноклітинний рак легенів і не-дрібноклітинний рак легенів, рак молочної залози, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, рак нирки, рак шлунка, гліобластома, первинний рак печінки та рак яєчника. Цей термін також особливо включає пухлину(и) головного мозку, як це більш докладно описано нижче.

Термін «пухлина(и) головного мозку» відноситься до злаякісних або доброякісних клітин головного мозку; він включає первинні та вторинні (метастатичні) пухлини. Первинні пухлини головного мозку включають, без обмеження, гліому (наприклад, мультиформну гліобластоми, астроцитому, гліому стовбура мозку, епендимому та олігодендрогліому), медулобластоми, менингіому, шванному (або акустичну неврому), краніофарингіому, пухлину із зародкових клітин мозку (наприклад, герміному), або пухлину пінеальної області. Термін «пухлина головного мозку» також використовується для опису вищезгаданого переліку захворювань, і ці терміни тут використовуються по чергово.

Термін «В-клітинні новоутворення» включає групу захворювань, яка включає хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ), множинну мієлому, і не-

Ходжкінську лімфому (НХЛ). Це неопластичні захворювання крові та кровотворних органів. Вони викликають порушення функції кісткового мозку та імунної системи, що веде до високої сприйнятливості до інфекцій і знекровлювання організму.

Термін «захворювання судин» включає без обмеження: гіперпроліферативні захворювання судин (наприклад, рестеноз і оклюзію судини), атеросклероз судин трансплантата, серцево-судинні захворювання, церебральні судинні захворювання та хвороби периферійних судин (наприклад, захворювання коронарної артерії, артеріосклероз, атеросклероз, не-атероматозний артеріосклероз або ушкодження судинної стінки). Він також використовується для позначення захворювань, які включають неогенез або проліферацію кров'яного русла ока, зокрема хороїдальну неоваскуляризацію.

Термін «нейронна регенерація» відноситься до стимуляції росту нейронних клітин і включає розростання нейриту та функціональне відновлення нейронних клітин. Захворювання та розлади, при яких нейронна регенерація може приносити значну терапевтичну користь, включають, але не обмежуються, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, хорею (хвороба) Гентінгтона, аміотрофічний латеральний склероз, невралгію трійчастого нерва, невралгію язикоглоткового нерва, параліч Белла, м'язову дистрофію, інсульт, прогресуючу м'язову атрофію, прогресуючу бульбарну спадкову м'язову атрофію, цервікальний спондилоз, синдром Гієна-Барре, деменцію, периферійні нейропатії та ушкодження периферійних нервів, викликані фізичним ушкодженням (наприклад, ушкодження або травма спинного мозку, ушкодження або травма сидничного або лицьового нерва) або патологічним станом (наприклад, діабетом).

Термін «патологічний стан, який є наслідком нейронного ушкодження або захворювання», включає без обмеження нейродегенеративне(і) захворювання(я), пухлину(и) головного мозку, інфекцію або запалення головного мозку та інші стани, які можуть призвести до загибелі або порушення функції нервових або гліальних клітин або тканин.

Термін «нейродегенеративний стан(и)» включає без обмеження хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, хворобу Гентінгтона, аміотрофічний латеральний склероз (АЛС), (окулофарингеальну) м'язову дистрофію, розсіяний склероз, пріонні хвороби (наприклад, хворобу Крейтцфельда-Якоба (ХКЯ)), хворобу Піка, деменцію з тількими Леві (або хворобу з тількими Леві) та/або хворобу моторних нейронів.

Термін «патологічні стани, які вражають центральну нервову систему, і потребують медикаментів, які перетинають гематоенцефалічний бар'єр» включають без обмеження патологічні стани, які є результатом ушкоджень або захворювань нервової системи, та будь-яких інших чинників, для ефективної терапії яких необхідний доступ медикаментів до нервових клітин.

Термін «фіброзні захворювання» відноситься до захворювань, пов'язаних з надлишковою про-

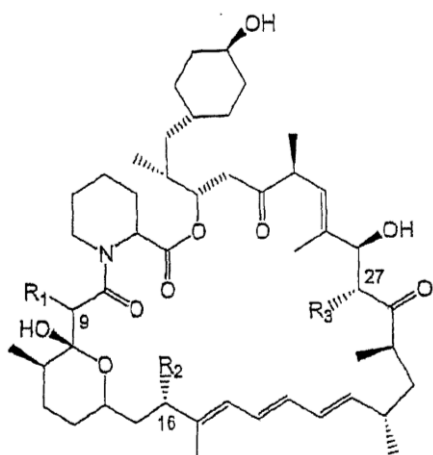
дукцією екстрацелюлярного матрикса і включає (без обмеження) саркоїдоз, келоїди, гломеруло-нефрит, захворювання нирок у термінальній стадії, фіброз печінки (включаючи, але не обмежуючись названими, цироз, алкогольне ураження печінки та стеатогепатит), хронічну нефропатію трансплантата, хірургічні спайки, васкулопатію, фіброз серця, легеневий фіброз (включаючи, але не обмежуючись названими, ідіопатичний легеневий фіброз та криптогенний фіброзуючий альвеоліт), макулярну дегенерацію, ретинопатію та вітреоретинопатію та фіброз, індукований хіміотерапією або радіацією.

Термін «хвороба «трансплантат проти хазяїна»» відноситься до ускладнень, які спостерігаються після трансплантації алогенних стовбурових клітин/кісткового мозку. Дана хвороба розвивається, коли клітини донора, які покликані протидіяти інфекції, ідентифікують організм пацієнта як такий, що є відмінним або чужорідним. Ці клітини, які покликані протидіяти інфекції, потім атакують тканини в організмі пацієнта так, як вони атакують інфекцію. ХТПХ вважається гострою, якщо вона розвивається протягом перших 100 днів після трансплантації і хронічною, якщо вона розвивається більше ніж через 100 днів після трансплантації. Зазвичай тканинами, які втягуються у цей процес, є печінка, шлунково-кишковий тракт та шкіра. Хронічна хвороба «трансплантат проти хазяїна» зустрічається приблизно у 10-40% пацієнтів після трансплантації стовбурових клітин/кісткового мозку.

Термін «біодоступність» відноситься до ступеня або швидкості, за якої ліки або інша речовина абсорбується або стає доступною у місці біологічної активності після застосування. Ця властивість залежить від ряду факторів, включаючи розчинність сполуки, швидкість абсорбції в кишківнику, ступінь зв'язування з білками та метаболізмом тощо. Різні тести на біодоступність, відомі особам, компетентним у даній галузі, описані тут (див. також Trepanier et al., 1998, Gallant-Haider et al., 2000).

Термін «пухлина або В-клітинні новоутворення, стійкі до одного або більше існуючого протиопухолевого агента(ів)» відноситься до видів пухлин або В-клітинних новоутворень, для яких, принаймні, один вид терапії, який зазвичай застосовується є неефективним. Ці види пухлин характеризуються здатністю до виживання після застосування, принаймні, одного неопластичного агента, при якому аналоги - нормальні клітини (наприклад ті, що регулюють ріст клітини такого ж самого походження) проявляють ознаки клітинної токсичності, клітинної загибелі або клітинної нерухомості (наприклад, не можуть ділитися). Зокрема, вони включають МФР-види пухлин або В-клітинних новоутворень, які експресують високий рівень Р-gp. Ідентифікація таких стійких видів пухлин або В-клітинних новоутворень у межах можливостей і звичайної практики лікарів або інших компетентних осіб.

Термін «аналоги 39-дезметоксирапаміцину» відноситься до сполук формули (I) наведеної нижче, або їх фармацевтично прийнятних солей.



де  $R_1$  є (H, H; або =O, а  $R_2$  та  $R_3$  незалежно є H, OH або  $OCH_3$ ). Ці сполуки також відносяться до «сполук даного винаходу», і ці терміни використовуються по чергово в даній заявці.

У даній заявці термін «аналог 39-дезметоксирапаміцину» включає 39-дезметоксирапаміцин як такий.

Термін «39-дезметоксирапаміцин» відноситься до сполуки формули (I) наведеної вище, або її фармацевтично прийнятної солі, при цьому  $R_1$  представлений =O, а  $R_2$  та  $R_3$  кожний представлені  $OCH_3$ .

Фармацевтично прийнятні солі аналогів 39-дезметоксирапаміцину включають звичайні солі, утворені фармацевтично прийнятними неорганічними або органічними кислотами або основами, також як і додатковими солями четвертинних амонієвих кислот. Більш конкретні приклади додаткових кислот включають соляну, бромоводню, сірчану, фосфорну, азотну, перхлорну, фумарову, оцтову, пропіонову, бурштинову, гліколеву, мурашину, молочну, малеїнову, винну, лимонну, пальмову, малонову, гідроксималеїнову, фенілоцтову, глутамінову, бензойну, саліцилову, толуолсульфонову, метансульфонову, нафталін-2-сульфонову, бензинсульфонову, нафтоїну, йодоводню, яблучну, стероїдну, дубильну та їм подібні кислоти. Інші кислоти, такі як щавлева, хоча та не є фармацевтично прийнятними, можуть бути корисними для приготування солей, які використовуються як інтермедіати при одержанні сполук даного винаходу та їх фармацевтично прийнятних солей. Більш конкретні приклади прийнятних основ солей включають солі натрію, літію, калію, магнію, алюмінію, кальцію, цинку, N,N-добензилетилендіаміну, хлоропрокаїну, холіну, діетаноламіну, етилендіаміну, N-метилглюкаміну та прокаїну. Надалі посилання на сполуки відповідно до даного винаходу включають як 39-дезметоксирапаміцин, так і його фармацевтично прийнятні солі.

Даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину в медицині, зокрема для лікування пухлин та В-клітинних новоутворень, індукції або підтримки імуносупресії, лікування відторгнення трансплантата, хвороби «трансплантат проти хазяїна», аутоімунних захворювань, нейродегенеративних станів, запальних захворювань, захворювань судин та фіброзних захворювань, стимуляції нейронної регенерації, лікування

неврологічних захворювань або нейродегенеративних станів або лікування грибкових інфекцій. Таким чином, даний винахід стосується використання аналогів 39-дезметоксирапаміцину, або їх фармацевтично прийнятних солей, для лікування патологічних станів, які є результатом ушкодження або захворювань нервової системи. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину, або його фармацевтично прийнятних солей, для лікування патологічних станів, які є результатом ушкодження або захворювань нервової системи. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину, які додатково відрізняються від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування патологічних станів, які є результатом ушкодження або захворювань нервової системи.

Даний винахід також стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, тобто аналога рапаміцину з підвищеною здатністю проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр, або його фармацевтично прийнятної солі, для лікування патологічних станів, які впливають на центральну нервову систему, і які потребують медикаменту, який проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр, тобто патологічних станів, при яких гематоенцефалічний бар'єр перешкоджає надходженню сполуки. В іншому конкретному втіленні, даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину, або його фармакологічно прийнятної солі, для лікування патологічних станів, які впливають на центральну нервову систему, де гематоенцефалічний бар'єр перешкоджає надходженню сполуки. В іншому конкретному втіленні, даний винахід стосується використання аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування патологічних станів, які впливають на центральну нервову систему, при яких гематоенцефалічний бар'єр перешкоджає надходженню сполуки.

В іншому окремому втіленні даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин і В-клітинних новоутворень. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин і В-клітинних новоутворень. В іншому (додатковому) окремому втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування пухлин і В-клітинних новоутворень. Даний винахід також зокрема стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлини(н) головного мозку. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування пухлини(н) головного мозку. Зокрема, даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину для лікування мультиформної гліобластоми. У конкретному втіленні

даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування мультиформної гліобластоми. В іншому конкретному втіленні, даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування мультиформної гліобластоми.

Даний винахід також стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування нейродегенеративних станів. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування нейродегенеративних станів. Зокрема, нейродегенеративні стани можуть бути обрані із групи, яка складається із хвороби Альцгеймера, розсіяного склерозу та хвороби Гентінгтона. Таким чином, в одному втіленні даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування хвороби Альцгеймера. В іншому окремому втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування хвороби Альцгеймера. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування хвороби Альцгеймера. У ще одному конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування розсіяного склерозу. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування розсіяного склерозу. В альтернативному втіленні даний винахід стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування хвороби Гентінгтона. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування хвороби Гентінгтона. У ще одному конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27, для лікування хвороби Гентінгтона. В альтернативному втіленні, даний винахід стосується способу лікування пухлин або В-клітинних новоутворень, способу індукції або підтримки імуносупресії, стимуляції нейронної регенерації, способу лікування грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, хвороби трансплантат проти хазяїна, аутоімунних захворювань, нейродегенеративних станів, запальних захворювань судин або фіброзних захворювань, що включає застосування в пацієнтів в ефективній кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину, зокрема 39-дезметоксирапаміцину або аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше поло-

женням 9, 16 або 27. Зокрема, даний винахід стосується способу лікування патологічних станів, які є результатом ушкоджень або захворювань нервової системи, який передбачає застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, або його фармацевтично прийнятної солі. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується способу лікування патологічних станів, які є результатом ушкоджень або захворювань нервової системи, який передбачає застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. Даний винахід також стосується способу лікування патологічних станів, які впливають на центральну нервову систему, при яких гематоенцефалічний бар'єр перешкоджає надходженню сполуки, шляхом застосування ефективної кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину, тобто аналога рапаміцину з підвищеною здатністю проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр, або його фармацевтично прийнятної солі. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27.

У кращому випадку, даний винахід стосується способу лікування пухлин або В-клітинних новоутворень, який передбачає введення пацієнтові ефективної кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину. В іншому конкретному кращому втіленні даний винахід стосується способу лікування пухлини(н) головного мозку, який передбачає введення пацієнтові ефективної кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. У ще одному конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. В іншому кращому втіленні даний винахід стосується способу лікування нейродегенеративних станів, який передбачає введення пацієнтові ефективної кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог



39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. Зокрема, перелік нейродегенеративних станів включає хворобу Альцгеймера, розсіяний склероз та хворобу Гентінгтона. Таким чином, в одному втіленні даний винахід стосується способу лікування хвороби Альцгеймера, який передбачає введення пацієнтові ефективної кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується способу лікування розсіяного склерозу, який передбачає введення пацієнтові ефективної кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. В альтернативному втіленні даний винахід стосується способу лікування хвороби Гентінгтона, який передбачає введення пацієнтові ефективної кількості аналога 39-дезметоксирапаміцину. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27.

Даний винахід також стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину у виробництві медикаменту для лікування пухлин або В-клітинних новоутворень, індукції або підтримки імуносупресії, стимуляції нейронної регенерації, лікування грибкових інфекцій, лікування відторгнення трансплантата, хвороби «трансплантат проти хазяїна», аутоімунних захворювань, нейродегенеративних станів, запальних захворювань, захворювань судин і фіброзних захворювань. Зокрема, даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, або його фармацевтично прийнятної солі, для приготування медикаменту для лікування патологічних станів, які є результатом ушкоджень або захворювань нервової системи. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27.

Даний винахід також стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину, тобто аналога рапаміцину з підвищеною здатністю проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр, або його фармацевтично прийнятної солі, для приготування медикаменту для лікування патологічних станів, які впливають на центральну нервову систему, при

яких гематоенцефалічний бар'єр перешкоджає надходженню сполуки. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27.

Даний винахід також конкретно стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину у виробництві медикаменту для лікування пухлини(лин) головного мозку. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. В іншому конкретному втіленні даний винахід конкретно стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину у виробництві медикаменту для лікування мультиформної гліобластоми. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27.

Даний винахід також стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину у виробництві медикаменту для лікування нейродегенеративних станів. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. Зокрема, перелік нейродегенеративних станів може включати хворобу Альцгеймера, розсіяний склероз та хворобу Гентінгтона. Таким чином, в одному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину у виробництві медикаменту для лікування хвороби Альцгеймера. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. В іншому конкретному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину у виробництві медикаменту для лікування розсіяного склерозу. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. В альтернативному втіленні даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину у виробництві медикаменту для лікування хвороби Гентінгтона. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин.

В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27.

Аналоги 39-дезметоксирапаміцину є близькими структурними аналогами рапаміцину, які виго-

товлені з використанням способів, описаних в WO 04/007709. Однак вони демонструють різний спектр активності рапаміцину, наприклад, як показано COMPARE-аналізом панелі клітинної лінії NCI 60 для 39-дезметоксирапаміцину та споріднених аналогів (див. таблицю 1 нижче).

Таблиця 1

Сполуки	Коефіцієнт Пірсона у порівнянні з рапаміцином
16-О-десмети-27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцин	0,435
27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцин	0,261
39-дезметоксирапаміцин	0,614
27-десметокси-39-дезметоксирапаміцин	0,313
CCI-779	0,86

COMPARE-аналіз використовує аналіз Пірсона для того, щоб порівняти активність двох сполук на панелі клітинної лінії NCI 60, і дає коефіцієнт кореляції, який показує, наскільки схожі спектри активності двох сполук, і це може показати, як пов'язані механізми їхньої дії. Як конкретний приклад, коефіцієнт Пірсона для рапаміцину та 39-дезметоксирапаміцину становить 0,614, це можна порівняти з коефіцієнтом Пірсона між рапаміцином та CCI-779 (40-гідрокси-ефірним похідним рапаміцину), який становить 0,86 (Dancey, 2000). Таким чином, виявляється, що аналоги 39-дезметоксирапаміцину мають спектр активності відмінний від такого рапаміцину.

Мульти-фармакологічна резистентність (МФР) є значною проблемою при лікуванні пухлин та В-клітинних новоутворень. Це основна причина розвитку фармакологічної резистентності при багатьох видах пухлин (Persidis A., 1999). Ліки, які спочатку діють, через деякий час стають повністю неефективними. МФР пов'язана зі зрослим рівнем аденозин-трифосфат-зв'язуючих касетних переносчиків (АЗК-переносників), зокрема з підвищенням експресії гена MDR1, який кодує Р-глікопротеїн (Р-гр) або гена MRP1, який кодує MRP1. Рівень експресії гена MDR1 коливається в широких межах серед клітинних ліній, виділених з пухлин, у деяких клітинних ліній він не виявляється, у той час як інші можуть демонструвати аж до 10 або 100-разового збільшення експресії в порівнянні зі стандартним контролем.

Деякі з позначених розходжень спектра активності між рапаміцином та 39-дезметоксирапаміцином можуть бути пояснені тим, що аналоги 39-дезметоксирапаміцину не є субстратом для Р-гр. Аналоги 39-дезметоксирапаміцину мають знижений вихід із клітин Сасо-2 у порівнянні з рапаміцином, і 39-дезметоксирапаміцин, як було показано, не є субстратом для Р-гр в *in vitro* аналізі на субстрат для Р-гр (див. приклади).

Таким чином, конкретний аспект даного винаходу стосується застосування аналогів 39-дезметоксирапаміцину для лікування пухлин або В-клітинних новоутворень, стійких до одного або більше існуючих протипухлинних агентів, тобто МФР видів пухлин або В-клітинних новоутворень. У конкретному аспекті даний винахід стосується

застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування Р-гр-експресуючих видів пухлин або В-клітинних новоутворень. У ще кращому втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для лікування видів пухлин або В-клітинних новоутворень з високим рівнем Р-гр-експресії. Зокрема, види пухлин або В-клітинних новоутворень з високим рівнем Р-гр-експресії можуть мати 2-разове, 5-разове, 10-разове, 20-разове, 25-разове, 50-разове або 100-разове підвищення експресії в порівнянні з контрольним рівнем. У конкретному аспекті вище вказаним аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті використання аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. Придатним контролем є клітини, які не експресують Р-гр, які мають низький рівень експресії Р-гр, або які мають низьку МФР; фахівці у даній галузі, можуть ідентифікувати такі клітинні лінії; як приклад, але не як обмеження, такі клітинні лінії включають: MDA435/LCC6, SBC-3/CDDP, MCF7, NCI-H23, A549/ATCC, EKVX, NCI-H226, NCI-H322M, NCI-H460, HOP-18, HOP-92, LXFL 529, DMS 114, HT29, HCC-2998, HCT-116, COLO 205, KM12, KM20L2, MDA-MB-231/ATCC, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T-47D, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, IGROV1, SK-OV-3, K-562, MOLT-4, HL-60(TB), RPMI-8226, SR, SN12C, RXF-631, 786-0, TK-10, LOX IMVI, MALME-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-5, SK-MEL-28, M14, UACC-62, UACC-257, PC-3, DU-145, SNB-19, SNB-75, SNB-78, U251, SF-268, SF-539, XF 498.

В альтернативному аспекті даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину для приготування медикаменту для використання його при лікуванні МФР видів пухлин або В-клітинних новоутворень. У конкретному аспекті даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину для приготування медикаменту для використання його при лікуванні Р-гр-експресуючих видів пухлин або В-клітинних новоутворень. У ще кращому втіленні даний винахід стосується застосування 39-дезметоксирапаміцину для приготування медикаменту для лікування таких видів пухлин або В-

клітинних новоутворень для яких характерним є високий рівень Р-гр-експресії. Зокрема, види пухлин або В-клітинних новоутворень з високим рівнем Р-гр-експресії можуть мати 2-разове, 5-разове, 10-разове, 20-разове, 25-разове, 50-разове або 100-разове підвищення експресії в порівнянні з контрольним рівнем. У конкретному аспекті застосування аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину, який використовується є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. Придатним є контроль описаний вище.

Методи визначення рівня експресії Р-гр у зразку обговорюються тут далі.

Таким чином, в іншому конкретному аспекті даний винахід стосується способу лікування Р-гр-експресуючих видів пухлин або В-клітинних новоутворень, який передбачає введення терапевтично ефективних кількостей аналога 39-дезметоксирапаміцину. У конкретному аспекті аналогом 39-дезметоксирапаміцину є 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті використовуваним аналогом 39-дезметоксирапаміцину є аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. Рівень експресії Р-глікопротеїну (Р-гр) для окремих типів пухлин може бути визначений фахівцем у даній галузі, за допомогою методів перелік яких включає, але не обмежений, метод ОТ-ПЦР у реальному часі (Szakacs et al., 2004; Stein et al., 2002; Langmann et al., 2003), метод імуногістохімії (Stein et al., 2002), або метод мікрочипів (Lee et al., 2003), ці методи приводяться тільки як приклад, інші придатні методи можуть використовуватися особами, компетентними у даній галузі.

39-дезметоксирапаміцин демонструє підвищену метаболічну стабільність у порівнянні з рапаміцином, як показано тут у прикладах. У ряді статей 39-метокси-група рапаміцину попередньо була ідентифікована як головна ділянка метаболічної атаки для перетворення рапаміцину в 39-О-дезметоксирапаміцин (Trepanier et al., 1998). Головні метаболіти рапаміцину мають значно знижену активність у порівнянні з вихідною сполукою (Gallant-Hainger et al., 2000; Trepanier et al., 1998). Навпаки, 39-дезметоксирапаміцин уже не має найбільш значимих ділянок для метаболічної атаки, що призводить до підвищення стабільності сполук (див. приклади). Разом з більш високою або еквівалентною ефективністю це забезпечує довший час напів-життя сполуки даного винаходу. Це додаткова несподівана перевага 39-дезметоксирапаміцину над рапаміцином.

Властивості 39-дезметоксирапаміцину, описані вище (те, що він не є субстратом для Р-гр, має підвищену метаболічну стабільність і зменшений вихід із клітини через Р-гр) показують, що 39-дезметоксирапаміцин має поліпшену біодоступність у порівнянні з вихідною сполукою рапаміцином. Таким чином, даний винахід присвячений

застосуванню у медицині 39-дезметоксирапаміцину, аналога рапаміцину з поліпшеною метаболічною стабільністю, поліпшеною проникаючою здатністю крізь клітинні мембрани, який відрізняється інгібуючим профілем відносно пухлинних клітин, зокрема для лікування пухлин або В-клітинних новоутворень.

Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить аналог 39-дезметоксирапаміцину, або його фармацевтично прийнятної солі, разом з фармацевтично прийнятним носієм. У конкретному аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить 39-дезметоксирапаміцин. В іншому конкретному аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить аналог 39-дезметоксирапаміцину, який додатково відрізняється від рапаміцину за одним або більше положенням 9, 16 або 27. У конкретному втіленні даний винахід стосується фармацевтичної композиції, як описано вище, яка специфічно складена для внутрішньовенного використання.

Рапаміцин і подібні сполуки, які перебувають на стадії або пройшли клінічні випробування, такі як CCI-779 і RAD001, мають поганий фармакологічний профіль, який включає погану метаболічну стабільність, погану проникаючу здатність, високий рівень виходу через Р-гр і погану біодоступність. Даний винахід стосується застосування аналога 39-дезметоксирапаміцину або його фармацевтично прийнятної солі, які мають поліпшені фармацевтичні властивості в порівнянні з рапаміцином.

Окремим несподіваним аспектом даного винаходу - є те, що аналоги 39-дезметоксирапаміцину проявляють фармакокінетичний профіль, який різко відрізняється у порівнянні з існуючими аналогами рапаміцину. Зокрема, аналоги 39-дезметоксирапаміцину демонструють підвищену проникаючу здатність крізь гематоенцефалічний бар'єр, і тому в головному мозку спостерігається підвищений вплив даних з'єднань у порівнянні з подібними аналогами при певному рівні в крові.

Ця відмінність фармакокінетики є зовсім несподіваною та не була відомою в існуючому рівні техніки. Відомий недолік терапії, яка використовується на даний час, захворювань включаючи нейродегенеративні стани та пухлини мозку - проблема доставки ліків до місця дії (див. Pardridge, 2005). Також повідомлялося, що це є проблемою при використанні в терапії існуючих аналогів рапаміцину; зокрема, дослідження ефективності CCI-779 у лікуванні мультиформної гліобластоми дозволило зробити висновок, що хоча системна концентрація була достатньою, гематоенцефалічний бар'єр був на перешкоді для доставки ліків до пухлини (Chang, 2005). Даний винахід, таким чином, уперше відкриває аналог рапаміцину з поліпшеною проникаючою здатністю для гематоенцефалічного бар'єра, і таким чином, значною користю при лікуванні пухлин головного мозку та нейродегенеративних станів.

Кращими аналогами 39-дезметоксирапаміцину для використання в будь-яких з аспектів даного винаходу, описаних вище, є ті, які додатково відрі-

зняються від рапаміцину за кожним з положень 9, 16 або 27, тобто бажано, щоб аналог 39-дезметоксирапаміцину не був власне 39-дезметоксирапаміцином. Інші кращі аналоги 39-дезметоксирапаміцину включають:

- аналог 39-дезметоксирапаміцину, який має гідроксильну групу в положенні 27, тобто R<sub>3</sub> представлений OH;

- аналог 39-дезметоксирапаміцину, який має водень у положенні 27, тобто R<sub>3</sub> представлений OH; або

- аналог 39-дезметоксирапаміцину, який має гідроксильну групу в положенні 16, тобто R<sub>2</sub> представлений OH.

Особи, компетентні в даній галузі, здатні визначити фармакокінетику та біодоступність сполуки даного винаходу з використанням *in vitro* і *in vivo* методів, відомих компетентним особам, включаючи, але не обмежуючись, ті, які описані вище та в Gallant-Haider et al., 2000 і Trepanier et al., 1998, і включені тут у вигляді посилань. Біодоступність сполуки визначається рядом чинників (наприклад, розчинністю у воді, проникненням крізь клітинні мембрани, ступенем зв'язування з білками, метаболізмом та стабільністю), кожний з яких може бути визначений аналізами *in vitro*, як описано в прикладах вище; особами, компетентними в даній галузі, відзначається, що поліпшення одного або більше факторів веде до поліпшення біодоступності сполуки. Крім того, біодоступність 39-дезметоксирапаміцину або його фармацевтично прийнятної солі може бути визначена методами *in vivo*, як це описано нижче більш детально, або в прикладах.

Методи аналізу *in vivo*.

Методи аналізу *in vivo* також можуть бути використані для визначення біодоступності такої сполуки, як 39-дезметоксирапаміцин. Загалом, вищевказані сполуки застосовувались на експериментальних тваринах (наприклад, на мишах або пацюках) як інтраперитонеально (*i/p*) або внутрішньовенно (*v/v*), так і перорально (*p/o*), і відбирали зразки крові з регулярними інтервалами, щоб оцінити, як концентрація ліків у плазмі змінюється протягом часу. Зміна з часом концентрації в плазмі може бути використана для того, щоб підрахувати абсолютну біодоступність сполуки як відсоток при використанні стандартних моделей. Приклад типового протоколу наведений нижче.

Мишам вводили дозу 3 мг/кг 39-дезметоксирапаміцину *v/v* або 10 мг/кг 39-дезметоксирапаміцину *p/o*. Зразки крові відбирали через 5 хв, 15 хв, 1 годину, 4 години та 24 години, і визначали концентрацію 39-дезметоксирапаміцину в зразку методом ВЕРХ. Зміна з часом концентрації в плазмі або в цільній крові потім могли бути використані, щоб одержати ключові параметри, такі як площа під графіком "концентрація в крові або плазмі - час" (ППГ - яка прямо пропорційна загальній кількості незмінених ліків, які надійшли до системної циркуляції), максимум (пік) концентрації в крові або плазмі; момент часу, в який спостерігається максимум концентрації ліків у крові або плазмі (час піка); додаткові фактори, які використовуються для точного визначення

біодоступності, включаючи: час напів-життя сполуки, загальний кліренс організмом, статичний об'єм розподілу та F%. Ці параметри потім аналізують не-розділяючими або розділяючими методами, щоб одержати підраховану процентну біодоступність, наприклад за типом методу див. Gallant-Haidner et al., 2000 і Trepanier et al., 1998, і посилання.

Ефективність 39-дезметоксирапаміцину може бути проаналізована в моделях *in vivo* для нейродегенеративних захворювань, які описані тут і які відомі особам, компетентним у даній галузі. Такі моделі включають, але не обмежуються переліченими, для хвороби Альцгеймера - тварин, які експресують людський *p*-амілоїдний попередник (APP) родинної спадкової хвороби Альцгеймера (FAD); тварин, які надлишково експресують людський APP дикого типу; тварин, які надлишково експресують *p*-амілоїд 1-42 (*pA*); тварин, які експресують FAD пресенілін-1 (PS-1) (наприклад, German and Tisch, 2004). Для розсіяного склерозу - модель експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) (див. Bradl, 2003 і Приклад 7). Для хвороби Паркінсона - 1-метил-4-феніл-1,2,3,β-тетрагідропіридинову (MPTP) модель або 6-гідроксидофамінову (6-OHDA) модель (див., наприклад, Emborg, 2004; Schober A., 2004). Для хвороби Гентінгтона є кілька моделей, включаючи модель на R6 лініях, утворених шляхом введення екзона 1 з гена хвороби Гентінгтона (ГБ) людини, який несе сильно розширені CAG повтори в мишах з зародкову лінію (Sathasivam et al., 1999) та інші (див. Hersch and Ferrante, 2004).

Вищезгадана сполука запропонована винаходом або її композиція можуть вводитися за допомогою будь-якого додаткового способу, наприклад, але без обмежуючись перерахованими, вони можуть бути застосовані парентерально, перорально, місцево (у тому числі буккально, сублінгвально або трансдермально), через медичні прилади (наприклад, стент), шляхом інгаляції або за допомогою ін'єкції (підшкірної або внутрішньом'язової). Лікування може складатися з одиначної дози або багатьох доз протягом певного періоду часу.

Якщо можливо застосувати аналог 39-дезметоксирапаміцину окремо, бажано представити його як фармацевтичну композицію, разом з одним або більше прийнятними носіями. Носій (і) повинен бути "прийнятним" у тому сенсі, що він повинен бути сумісним із сполуками винаходу, і не заподіяти шкоди пацієнтові внаслідок його застосування. Приклади придатних носіїв більш детально описані нижче.

Аналог 39-дезметоксирапаміцину може застосовуватися окремо або в комбінації з іншими терапевтичними агентами; спільне застосування двох (або більше) агентів дозволяє значно знизити дозу кожного з використовуваних речовин, таким чином, знижуючи можливі побічні ефекти. Підвищена метаболічна стабільність 39-дезметоксирапаміцину дає ту додаткову перевагу у порівнянні з рапаміцином, що він з меншою ймовірністю може спричинити взаємодію між ліками, якщо він використовується в комбінації з ліками,

які є субстратами для ферментів родини P450, як це відбувається з рапаміцином (Lampen et al., 1998).

Отже, в одному втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину застосовується разом з іншим терапевтичним агентом для індукції або підтримки імуносупresi, для лікування відторгнення трансплантата, хвороби "трансплантат проти хазяїна", аутоімунних порушень або запальних захворювань, включаючи такі кращі агенти, але не обмежуючись переліченими, імунорегуляторні агенти, наприклад азатіоприн, кортикостероїди, циклофосфамід, циклоспорин А, FK506, мікофенолят мофетил, ОКТ-3 і АТГ.

В альтернативному втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину вводиться разом з іншим терапевтичним агентом для лікування пухлин і В-клітинних новоутворень, перелік кращих агентів включає, але не обмежується перерахованими, метотрексат, лейковорин, адриаміцин, пренізон, блеоміцин, циклофосфамід, 5-фторурацил, паклітаксель, доцетаксель, вінкрестин, вінбластин, вінорельбін, доксорубіцин, тамоксифен, тореміфен, мегестрол ацетат, анастрозол, гoserелін, анти-HER2 моноклональні антитіла (наприклад, Герцептин™), капецитабін, ралоксифен гідрохлорид, інгібітори рецептора епідермального ростового фактора (наприклад, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), інгібітори фактора росту васкулярного ендотелію (наприклад, Avastin™), інгібітори протеасом (наприклад, Velcade™), Glivec® або інгібітори hsp90 (наприклад, 17 AAG). Крім того, 39-дезметоксирапаміцин може застосовуватися у поєднанні з іншими видами лікування, включаючи, але не обмежуючись перерахованими, радіотерапію або хірургію.

В одному втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину застосовується разом з іншим терапевтичним агентом для лікування захворювань судин, перелік кращих агентів включає, але не обмежується перерахованими, ACE інгібітори, антагоністи рецептора ангіотензину II похідні фібрової кислоти, інгібітори HMG-CoA-редуктази; агенти, які блокують бета-адренергічні рецептори, блокатори кальцієвих каналів, антиоксиданти, антикоагулянти та інгібітори тромбоцитів (наприклад, Plavix™).

В іншому втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину вводиться разом з іншим терапевтичним агентом для стимуляції нейронної регенерації, перелік кращих агентів включає, але не обмежується перерахованими, нейротрофічні фактори, наприклад, фактор росту нервових клітин; фактор росту, виділений із гліальних клітин; фактор росту, виділений з головного мозку; циліарний нейротрофічний фактор і нейротрофін-3.

В одному втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину вводиться разом з іншим терапевтичним агентом для лікування грибкових інфекцій; перелік кращих агентів включає, але не обмежується перерахованими, амфотеріцин В, флюцитозин, ехінокандини (наприклад, каспофунгін, анідулафунгін або мікафунгін), гризеофульвін, імідазольні або триазольні протигрибкові агенти (наприклад, клортимазол, міконазол, кетоконазол,

еконазол, бутоконазол, оксиконазол, терконазол, ітраконазол, флюконазол або вориконазол).

В одному втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину застосовується разом з іншим терапевтичним агентом для лікування хвороби Альцгеймера; перелік кращих агентів включає, але не обмежується перерахованими, інгібітори холінестерази, наприклад, донепезил, ривастигмін, і галантаміл; антагоністи рецептора Nтил-О-аспартату, наприклад, мемантин.

В одному втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину вводиться разом з іншим терапевтичним агентом для лікування розсіяного склерозу; перелік кращих агентів включає, але не обмежується перерахованими, інтерферон бета-1b, інтерферон бета-1a, глатирамер, мітоксантрон, циклофосфамід, кортикостероїди (наприклад, метилпреднізолон, преднізон, дексаметазон).

При спільному введенні використовують засоби доставки двох або більше терапевтичних агентів пацієнтові як частин одного і того ж самого режиму лікування, відомі фахівцям у даній галузі. Чи застосовуються два або більше агентів одночасно в одній композиції, не є істотним. Ці агенти можуть застосовуватися в різних композиціях у різний час.

Композиція може для зручності бути представлена в одиничному дозуванні та може бути виготовлена за допомогою будь-якого зі способів, добре відомих у фармацевтиці. Такі способи включають стадію впровадження в асоціацію активного інгредієнта (сполуки винаходу) з носієм, який складається з одного або більше додаткових агентів. Загалом, композиція готується шляхом однорідного та міцного зв'язування активного інгредієнта з рідкими носіями, або тонко розділеними твердими носіями, або тим і іншим, і потім, якщо необхідно, формування продукту.

Аналог 39-дезметоксирапаміцину зазвичай вводиться внутрішньовенно, перорально або кожним з парентеральних способів, у формі фармацевтичної композиції, яка містить активний інгредієнт, додатково у формі нетоксичної органічної, неорганічної, кислоти, основної, додаткової солі, у фармацевтично прийнятній формі дозування. Залежно від захворювання та пацієнта, якому він призначений, а також способу застосування, композиція може застосовуватися в різній дозі.

Фармацевтичні композиції даного винаходу, прийнятні для ін'єкційного застосування, включають стерильні водяні розчини або суспензії. Більше того, композиції можуть бути можуть бути у формі стерильних порошків для безпосереднього приготування перед введенням таких стерильних ін'єкційних розчинів або суспензій. У всіх випадках, остаточна ін'єкційна форма повинна бути стерильною та повинна бути досить рідкою для легкого введення шприцем.

Фармацевтичні композиції повинні бути стабільні в умовах виробництва та зберігання; так, вони повинні бути забезпечені від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії та гриби. Носій може бути розчинником або дисперсійним середовищем, який містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рід-

кий поліетиленгліколь), рослинні олії, та їхні прийнятні суміші.

Наприклад, аналог 39-дезметоксипрапаміцину може застосовуватися перорально, буккально або сублінгвально у формі таблеток, капсул, овул, еліксирів, розчинів або суспензій, які можуть містити смакові або забарвлюючі агенти, добавки для негайного, уповільненого, або контрольованого вивільнення.

Розчини або суспензії аналога 39-дезметоксипрапаміцину, прийнятні для перорального застосування, можуть також містити наповнювачі, наприклад N,N-диметилацетамід, диспергуючі речовини, наприклад, полісорбат 80, сурфактанти та солюбілізатори, наприклад, поліетиленгліколь, Phosal 50PG (який складається з фосфатиділ-холіну, жирних кислот сої, етанолу, моно/дигліцеридів, пропіленгліколю та аскорбілпальмітату).

Такі таблетки можуть містити наповнювачі, такі як мікрокристалічна целюлоза, лактоза (наприклад, моногідрат лактози або ангідрид лактози), цитрат натрію, карбонат кальцію, двозаміщений фосфат кальцію та гліцин, бутильований гідрокситолуол (Е321), кросповідон, гіпромелоза; дезінтегранти, такі як крохмаль (переважно кукурудзяний, картопляний або крохмаль із тапіоки), натрію крохмаль гліколят, кроскармелоза натрію, і певні комплексні силікати, і з'єднуючі речовини для грануляції, такі як полівінілпіролідон, гідроксипропіл метилцелюлоза (ГПМЦ), гідроксипропілцелюлоза (ГПЦ), макрогол 8000, сахароза, желатин і акація. Крім того, можуть бути додані лубриканти, такі як стеарат магнію, стеаринова кислота, гліцерилбегенат і тальк.

Тверді композиції подібного типу можуть також застосовуватися як наповнювачі в желатинових капсулах. Кращі щодо цього наповнювачі включають лактозу, крохмаль, целюлозу, молочний цукор і поліетиленгліколь з високою молекулярною масою. Для водних суспензій і/або еліксирів, сполуки винаходу можуть бути комбіновані з різними підсолоджувачами або ароматизаторами, барвниками або фарбами, з емульгаторами та/або суспендуючими агентами та з розріджувачами, такими як вода, етанол, пропіленгліколь і гліцерин, або їхніми комбінаціями.

Таблетки можуть бути виготовлені шляхом пресування або формування, з одним або більше додатковим інгредієнтом. Пресовані таблетки можуть бути виготовлені шляхом пресування на придатній машині активних інгредієнтів у вільно-текучій формі, такий як порошок або гранули, змішуються додатково з з'єднуючою речовиною (наприклад, повідоном, желатином, гідроксипропілметилцелюлозою), лубрикантом, інертним розріджувачем, консервантом, дезінтегрантом (наприклад, натрію крохмаль-гліколятом, перехрестно-зв'язаним повідоном, перехрестно-зв'язаною натрію карбоксиметил-целюлозою), поверхнево-активним або диспергуючим агентом. Наповнені таблетки можуть бути виготовлені шляхом наповнення на придатній машині суміші порошкових сполук із інертним рідким розріджувачем. Ці таблетки можуть додатково бути покриті оболонкою

або на них нанесено зарубку, або вони можуть бути виготовлені таким чином, щоб забезпечити повільне або контрольоване вивільнення активного інгредієнта, шляхом використання, наприклад, гідроксипропілметилцелюлози в різних пропорціях, щоб забезпечити бажаний профіль вивільнення.

Форми складу відповідно до даного винаходу, прийнятні для перорального застосування, можуть бути представлені дискретними одиницями, такими як капсули, облатки або таблетки, кожна з них містить задану кількість активного інгредієнта; такими як порошок або гранули; як розчин або суспензія у водному або не-водному середовищі; або як водно-олійна або олійно-водна рідка емульсія. Активний інгредієнт може також бути представлений як болус, електуарій або паста.

Форма складу, прийнятна для місцевого застосування в роті, включає льодяники, які містять активний інгредієнт у смаковій основі, звичайно сахарозі та акації або трагаканті; пастилки, які містять активний інгредієнт в інертній основі, такий як желатин або гліцерин, або сахароза або акація; і спреї, які містять активний інгредієнт у прийнятному рідкому носії.

Можна зрозуміти, що на додаток до інгредієнтів, спеціально згаданих вище, фармакологічна форма даного винаходу може включати інші агенти, прийнятні в даній галузі, яка відноситься до типу такої форми, наприклад, ті, які є прийнятними для перорального застосування, можуть включати ароматизатори.

Фармацевтичні композиції, пристосовані для місцевого застосування, можуть бути виконані у вигляді мазей, кремів, суспензій, лосьонів, порошоків, розчинів, паст, гелів, імпрегнованих пов'язок, спреїв, аерозолів або олій, трансдермальних пристроїв, присипок, та тому подібного. Ці композиції, які містять активні агенти, можуть бути виготовлені за допомогою стандартних способів. Так, вони можуть також містити сумісні стандартні носії та добавки, такі як консерванти, розчинники для того, щоб полегшити проникнення ліків, емульгатор у кремах або мазях, і етанол або олеїловий спирт для лосьонів. Такі носії можуть становити від близько 1% до близько 98% композиції. Найчастіше вони становлять до приблизно 80% композиції. Тільки як ілюстрація, крем або мазь готують змішуванням достатніх кількостей гідрофільного матеріалу та води, яка містить близько 5-10% сполуки за масою, у достатніх кількостях для виробництва крему або мазі, які мають бажану консистенцію.

Фармацевтичні композиції, пристосовані для трансдермального застосування, можуть бути представлені у вигляді дискретних пов'язок, призначених для того, щоб залишатися в тісному контакті з епідермісом реципієнта протягом тривалого періоду часу. Наприклад, активний інгредієнт може вивільнятися з пов'язки шляхом іонтофорезу.

Для застосування на зовнішніх тканинах, наприклад у роті і на шкірі, композицію переважно застосовують у вигляді місцевої мазі або крему. При використанні у вигляді мазі, активний інгредієнт

ент може застосовуватися або на парафіновій, або на мазевій основі, яка може змішуватися з водою.

Крім того, активний агент може застосовуватися в складі крему з олійно-водною або водно-олійною кремовою основою.

Для парентерального застосування, рідка окрема форма дозування готується з використанням активного інгредієнта та стерильного розчинника, наприклад, але без обмеження, води, спиртів, поліолів, гліцерину та рослинних олій, кращою є вода. Активний інгредієнт, залежно від розчинника та застосованої концентрації, може бути або суспендований, або розчинений у розчиннику. У приготування розчинів активний інгредієнт може бути розчинений у воді для ін'єкцій і підданий стерилізуючій фільтрації, перед розливом у придатні флакони або ампули та запаюванням.

Бажано, щоб такі агенти як анестетики, консерванти та буферні агенти, були розчинені в розчиннику. Для того щоб підвищити стабільність, композиція може бути заморожена після розливу у флакони, і вода вилучена під вакуумом. Ліофільно висушений порошок потім закорковується у флакони, а також може додаватися супутній флакон води для ін'єкцій для розчинення перед використанням.

Парентеральні суспензії готуються в основному у такий же самий спосіб, як і розчини, за винятком того, що активний інгредієнт суспендується в розчиннику замість розчинення, і стерилізація не може здійснюватися шляхом фільтрації. Активний інгредієнт може бути стерилізований шляхом впливу оксиду етилену перед суспендуванням у стерильному розчиннику. Бажано, щоб у композицію включався сурфактант або зволожуючий агент для того, щоб полегшити однорідний розподіл активного інгредієнта.

Аналог 39-дезметоксирапаміцину може також застосовуватися з використанням відомих медичних приладів. Наприклад, в одному втіленні, фармацевтична композиція даного винаходу може застосовуватися за допомогою гіподермального безтолкового інжектора, такого як інжектор, описаний в US 5 339 163; US 5 383 851; US 5 312 335; US 5 064 413; US 4 941 880; US 4 790 824, або US 4 596 556. Приклади добре відомих імплантатів і модулів, придатних для даного винаходу, включають: US 4487603, який описує імплантований мікро-інфузійний насос для введення ліків з контролюваною швидкістю; US 4 486 194, який описує терапевтичний пристрій для введення медикаментів крізь шкіру; US 4 447 233, який описує інфузійний насос для ліків для подачі їх з точною інфузійною швидкістю; US 4 447 22 4, який описує імплантовані інфузійні апарати змінного потоку для тривалої подачі ліків; US 4 439 196, який описує осмотичну систему доставки ліків, яка має багатокамерні компартменти; і US 4475196, який описує осмотичну систему доставки ліків. В іншому конкретному втіленні аналог 39-дезметоксирапаміцину може застосовуватися з використанням елюючого ліки стента, наприклад, такого, як описаний в WO 01/87263 і подібних публікаціях, або такого, як описаний Perm

(Perm, E.C, 2005). Багато інших подібних імплантатів, систем доставки та модулів відомі особам компетентним в даній галузі.

Призначена для введення доза сполуки даного винаходу може змінюватися відповідно до виду конкретної сполуки, супутнього захворювання, пацієнта, природи захворювання та ступенем її тяжкості та фізичним станом пацієнта, і обраним способом застосування. Придатна доза може бути швидко визначена особою, компетентною у даній галузі.

Композиція може містити сполуки винаходу від 0,1% за вагою, бажано від 5 до 60%, найкраще від 10 до 30% за вагою, залежно від способу застосування.

Фахівцями в даній галузі визнається, що оптимальна кількість і інтервали індивідуальних дозувань сполуки винаходу визначаються природою та ступенем стану, при якому його застосовують; формою, шляхом і місцем застосування, а також віком і станом конкретного пацієнта, який потребує лікування, і те, що лікар остаточно визначає достатнє для використання дозування. Це дозування може повторюватися так часто, як це буде необхідно. Якщо розвиваються побічні ефекти, кількість і/або частота дозування можуть бути змінені або зменшені, відповідно до звичайної клінічної практики.

Фіг.1. показує структуру рапаміцину.

Фіг.2. показує шлях фрагментації 39-дезметоксирапаміцину.

Фіг.3. показує результати вестерн-блотингу, які підсумовують mTOR-інгібіторну активність 39-дезметоксирапаміцину та рапаміцину.

Фіг.4. %T/C величин для всіх аналізованих концентрацій паклітакселю (A та C) і 39-дезметоксирапаміцину (Y та D) для нормальних (A та B) або високо-P-gp-експресуючих (C та D) клітинних ліній.

Фіг.5. A - показує загальну площу під графіком (ППГ) протягом 0-24 годин для зразків тканини головного мозку або крові після одиничного в/в або п/о застосування рапаміцину або 39-дезметоксирапаміцину.

B - показує рівень 39-дезметоксирапаміцину та рапаміцину, що виявляється в тканині головного мозку протягом часу після одиничного в/в застосування.

Фіг.6. A - показує прогресування захворювання на EAE моделі при профілактичному режимі. Наведені величини є медіаною від розчинника або групи, що лікується.

B - показує прогресування захворювання на EAE моделі при терапевтичному режимі. Наведені величини є медіаною від розчинника або групи, що лікується.

Фіг.7. Графік, який показує відносний % виживання мишей після індукції гліоми шляхом стереотаксичного введення клітин U87-MG. Зафарбовані ромби представляють групу, яка не лікується, зафарбовані квадрати - групу, яка лікується, незафарбовані кола представляють групу, яка лікується 39-дезметоксирапаміцином.

Приклади  
Матеріали та методи  
Матеріали

Всі реагенти, використані в прикладах, наведених нижче, отримані з комерційних джерел, якщо немає інших вказівок.

Культура

*S.hygroscopicus* MG2-10 [IJMNOQLhis] (WO 04/007709, Gregory et al., 2004) культивували на агарових пластинах у середовищі 1 (див. нижче) при 28°C. Запас спор готовили після вирощування на середовищі 1, підготували в 20% в/о гліцерині: 10% в/о лактози в дистильованій воді, і зберігали при -80°C. Вегетативні культури готували шляхом

інокуляції 0,1 мл замороженого запасу в 50 мл середовища 2 (див. нижче) в 250-мл флаконі. Культури інкубували від 36 до 48 годин при 28°C, 300 об./хв.

Метод одержання

Рослинні культури інокулювали 2,5-5% о/о в середовище 3. Культивування проводили протягом 6-7 днів, 26°C, 300 об./хв.

Процедура живлення

Процедуру додавання циклогексан-карбокислотної кислоти виконували через 24-48 години після інокуляції та доводили до 1-2 мМ концентрації, якщо не було вказано інакше.

Середовище 1.

Компонент	Джерело	№ за каталогом	На літр
Вимочений кукурудзяний порошок	Sigma	C-8160	2,5 г
Дріжджовий екстракт	Difco	0127-17	3 г
Карбонат кальцію	Sigma	C5929	3 г
Сульфат заліза	Sigma	F8633	0,3 г
Бакто-агар			20 г
Пшеничний крохмаль	Sigma	S2760	10 г
Вода до			1 л

Середовище потім стерилізували автоклавуванням при 121°C, 20 хвилин.

Середовище 2: RapV7 середовище для посіву.

Компонент	На літр
Підсмажена нутрисоя (ADM Ingredients Ltd)	5 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	35 г
Екстракт із зерен кукурудзи (Sigma)	4 г
Глюкоза	10 г
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 г
Молочна кислота (80%)	1, 6 мл
CaCO <sub>3</sub> (Caltec)	7 г
Доводять pH до 7,5 1M NaOH	

Середовище потім стерилізували автоклавуванням при 121°C, 20 хв.

Після стерилізації 0,16 мл 40% розчину глюкози додавали до кожних 7 мл середовища.

Середовище 3: Середовище MD6 (середовище ферментації).

Компонент	На літр
Підсмажена нутрисоя (ADM Ingredients Ltd)	30 г
Кукурудзяний крохмаль (Sigma)	30 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	19 г
Дріжджі (Allinson)	3 г
Екстракт із зерен кукурудзи (Sigma)	1 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 г
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 г
NaCl	5 г

CaCO <sub>3</sub> (Caltec)	10 г
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	10 мг
MnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2, 5 мг
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	120 мг
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	50 мг
MES (2-морфолінетан-сірчаної кислоти моногідрат)	21,2 г
pH скорегований до 6,0 1M NaOH	

Перед стерилізацією до 1 л середовища додавали 0,4 мл D-амілази Sigma (BAN 250).

Середовище стерилізували 20 хв при 121°C.

Після стерилізації 0,35 мл стерильної 40% фруктози та 0,10 мл L-лізину (140 мг/мл води, простерилізований шляхом фільтрації) додавали до кожних 7 мл.

Середовище 4: RapV7a середовище для посіву.

Компонент	На літр
Підсмажена нутрисоя (ADM Ingredients Ltd)	5 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	35 г
Екстракт із зерен кукурудзи (Sigma)	4 г
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 г
Молочна кислота (80%)	1,6 мл
CaCO <sub>3</sub> (Caltec)	7 г
Доводять pH до 7,5 1M NaOH	

Середовище потім стерилізували автоклавуванням при 121°C, 20 хв.

Середовище 5: MD6/5-1 (середовище ферментації).



Компонент	На літр
Підсмажена нутрисоя (ADM Ingredients Ltd)	15 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	50 г
Дріжджі (Allinson)	3 г
Екстракт із зерен кукурудзи (Sigma)	1 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 г
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 г
NaCl	13 г
CaCO <sub>3</sub> (Caltec)	10 г
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	3,5 мг
MnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	15 мг
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	150 мг
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	60 мг
SAG 471	0,1 мл

Середовище стерилізували 30 хв при 121°C.

Після стерилізації додавали 15 г фруктози на літр.

Через 48 годин додавали 0,5 г/л L-лізину.

Аналітичні методи

Метод А

Об'єм, що вводиться: 0,005-0,1 мл (залежно від чутливості). ВЕРХ виконували на картриджах Agilent "Spherisorb" "Rapid Resolution" SB C8, 3 мікрон, 30 мм × 2,1 мм, з використанням рухомої фази:

Рухома фаза А: 0,01% розчин мурашиної кислоти в очищеній воді.

Рухома фаза В: 0,01% розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі.

Швидкість потоку: 1 мл/хв.

Використовували лінійний градієнт, від 5%B в 0 хв до 95%B до 2,5 хв, утримуючи 95%B протягом 4 хв, повертаючись до 5%B до наступного циклу. Детекцію здійснювали за рахунок поглинання в УФ-області при 254 нм та/або шляхом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням (позитивною або негативною), з використанням мікромас-спектрометра Microraass Quattro-Micro Instrument.

Метод В

Об'єм, що вводиться, 0,02 мл. ВЕРХ виконували на колонці 3 мікрони BDS C18 Hypersil (Thermo-Hypersil-Keystone Ltd), 150 × 4,6 мм, що зберігається при температурі 50°C, з використанням рухомої фази:

Рухома фаза А: Ацетонітрил (100 мл), трифтороцтова кислота (1 мл), 1М ацетат амонію (10 мл), доводили об'єм до 1 л деіонізованою водою.

Рухома фаза В: Деіонізована вода (100 мл), трифтороцтова кислота (1 мл), 1М ацетат амонію, доводили об'єм до 1 л ацетонітрилом.

Швидкість потоку: 1 мл/хв.

Використовували лінійний градієнт від 55%B-95%B протягом 10 хвилин, потім протягом 2 хвилин при 95%B; 0,5 хвилин до 55%B та наступні 2,5 хв при 55%B. Детекцію сполук здійснювали за рахунок поглинання в УФ-області при 280 нм.

#### Метод С

Система ВЕРХ складалася з Agilent HP1100, хроматографію проводили на колонці 3 мікрони BDS C18 Hypersil (Thermo-Hypersil-Keystone Ltd), 150 × 4,6 мм, що зберігається при температурі 40°C, з використанням рухомої фази:

Рухома фаза А: деіонізована вода.

Рухома фаза В: Ацетонітрил.

Швидкість потоку: 1 мл/хв.

Дану систему приєднували до електрораспилюючого мас-спектрометра Bruker Daltonics Esquire 3000. Позитивно-негативне перемикання використовували в діапазоні сканування від 500 до 1000 дальтон.

Використовували лінійний градієнт від 55%B до 95%B протягом 10 хвилин, потім протягом 2 хвилин при 95%B; 0,5 хвилин до 55%B та наступні 2,5 хв при 55%B.

Біоаналіз протипухлинної активності in vitro

Оцінку протипухлинної активності сполук in vitro на панелі 12 людських пухлинних клітинних ліній у моношаровому проліфераційному тесті проводили на Oncotest Testing Facility, Інститут експериментальної онкології, Oncotest GmbH, Фрейбург. Характеристики 12 відібраних клітинних ліній узагальнені у таблиці 2.

Таблиця 2

#### Аналізовані клітинні лінії

#	Клітинні лінії	Характеристики
1	MCF-7	Молочна залоза, стандарт NCI
2	MDA-MB-231	Молочна залоза, PTEN-позитивні, стійкі до 17-AAG
3	MDA-MB-468	Молочна залоза, PTEN-негативні, стійкі до 17-AAG
4	NCI-H460	Легені, стандарт NCI
5	SF-268	ЦНС, стандарт NCI
6	OVCAR-3	Яєчники, p85-мутантні. Ампліфікований АКТ
7	A498	Нирки, висока експресія MDR
8	GXF 251L	Шлунок
9	MEXF 394NL	Меланома
10	UXF 1138L	Матка
11	LNCAP	Простата, PTEN-негативні
12	DU145	Простата, PTEN-позитивні

Клітинні лінії Oncotest були виділені із ксенографтів пухлин людини, як описано Roth et al., 1999. Походження донорських ксенографтів описане Fiebig et al., 1992. Інші клітинні лінії були отримані від NCI (H460, SF-268, OVCAR-3, DU145, MDA-MB-231, MDA-MB-468) або придбані в DSMZ, Брауншвейг, Німеччина (LNCAP).

Всі клітинні лінії, якщо це не вказується особливо, вирощували при 37°C у зволоженій атмосфері (95% повітря, 5% CO<sub>2</sub>) у готовому середовищі, яке містить середовище RPMI 1640, 10% ембріональну телячу сироватку, та 0,1 мг/мл гентаміцину (PAA, Кельбе, Німеччина).

Моношаровий аналіз - Протокол 1.

Щоб оцінити ефекти аналізованої сполуки(к) на ріст 12 людських пухлинних клітинних ліній, використовували модифікований пропідіум-іодидний тест (Dengler et al., 1995).

Коротко кажучи, клітини збирали з культур в експонентній фазі за допомогою трипсинізації, підраховували та розміщували в 96-комірковій плоскодонній мікротитрувальній планшеті при щільності клітин, яка залежить від клітинної лінії (5-10.000 життєздатних клітин/на комірку). Через 24 години відновлення, для того, щоб дозволити клітинам відновити експонентний ріст, у комірки додавали 0,01 мл культурального середовища (6 контрольних комірок на планшет) або культурального середовища, яке містить 39-дезметоксипамаміцин. Кожну концентрацію додавали в трьох повторностях. 39-дезметоксипамаміцин вносили у двох концентраціях (0,001 мМ та 0,01 мМ). Через 4 дні інкубації, клітинне культуральне середовище з- або без 39-дезметоксипамаміцину заміняли на 0,2 мл водного розчину пропідіум-іодиду (PI) (7 мг/л). Щоб визначити пропорцію життєздатних клітин, змінювали проникність мембран клітин шляхом заморожування планшетів. Після розтавання планшетів, вимірювали флуоресценцію з використанням ридера для мікропланшетів Cytofluor 4 000 (збудження 530 нм, емісія 620 нм), задаючи прямий зв'язок стосовно загальної кількості життєздатних клітин.

Пригнічення росту виражали як відношення обробки до контролю  $\times 100$  (%T/C). Для активних сполук величини IC<sub>50</sub> та IC<sub>70</sub> визначали, наносячи на графік концентрацію сполуки проти життєздатності клітин.

#### Моношаровий тест - Протокол 2:

Людські пухлинні клітинні лінії від онкоскринінгових панелей Національного Інституту Онкології (NCI) вирощували на середовищі RPMI 1640, яке містить 5% ембріональну телячу сироватку та 2 мМ L-глутаміну (Boyd and Paull, 1995). Клітини інокулювали в комірки 96-коміркового планшета для мікротитрування в 0,1 мл і щільності клітин від 5000 до 40000 клітин/на комірку, залежно від часу подвоєння індивідуальних клітинних ліній. Після інокуляції клітин, планшети для мікротитрування інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% повітря та 100% відносної вологості протягом 24 годин перед внесенням експериментальних ліків.

Через 24 години, два планшети з кожної клітинної лінії фіксували *in situ* трихлороцтовою кислотою (ТХО) для подання вимірювання клітинної популяції для кожної клітинної лінії під час додавання ліків (Tz). Експериментальні ліки солюбілізували в диметилсульфоксиді до 400-разової бажаної кінцевої максимальної тестової концентрації, і зберігали в замороженому вигляді до використання. До часу додавання ліків, аліквоти замороженого концентрату відтавали та розбавляли до подвійної відповідно до бажаної кінцевої максимальної тестової концентрації за допомогою повного середовища, яке містить 0,05 мг/мл генгаміцину. Додатково готували чотири серійних розведення, десятикратних або 1/2 log-, щоб одержати в цілому п'ять концентрацій ліків плюс контроль. Аліквоти 0,1 мл цих різних розведень ліків додавали у відповідні комірки мікропланшета, які

вже містять 0,1 мл середовища, одержуючи необхідну кінцеву концентрацію ліків.

Після додавання ліків, планшети інкубували додатково протягом 48 годин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% повітря, і 100% відносній вологості. Для клітин, які прилипали, аналіз закінчували додаванням холодної ТХО. Клітини фіксували *m situ* обережним додаванням 0,05 мл холодної 50% (в/о) ТХО (до кінцевої концентрації 10% ТХО) і інкубували 60 хвилин при 4°C. Надосадову рідину зливали, планшети відмивали п'ятиразово водою з водогону та висушували на повітрі. 0,1 мл 0,4% розчину (в/о) сульфородаміну Б (СРБ) в 1% оцтовій кислоті додавали в кожную комірку, і інкубували планшети 10 хв за кімнатної температури. Після фарбування незв'язаний барвник видаляли п'ятиразовим промиванням 1% оцтовою кислотою, і висушували планшети на повітрі. Зв'язаний барвник послідовно солюбілізували в 10 мМ трис(оксиметил)амілометані, поглинання визначали на автоматичному ридері мікропланшетів при довжині хвилі 515 нм. Для суспензій клітин методологія була тією ж самою, за винятком того, що тест закінчували фіксуванням осілих клітин на дні комірки обережним додаванням 0,05 мл 80% ТХО (до кінцевої концентрації 16% ТХО). Використовуючи сім вимірювань поглинання [час нуля (T<sub>0</sub>), контрольний ріст (C), і аналізований ріст у присутності ліків на п'яти рівнях концентрації (T<sub>i</sub>)], підраховували відсоток росту за кожного рівня концентрації ліків. Відсоток пригнічення росту розраховували як:

$$[(T_i - T_0)/(C - T_0)] \cdot 100 \text{ для концентрацій, де } T_i \neq T_0$$

$$[(T_i - T_0)/T_0] \cdot 100 \text{ для концентрацій, де } T_i = T_0$$

Розраховували три параметри відповіді на дозу для кожного експериментального агента. Пригнічення росту на 50% (GI<sub>50</sub>) розраховували з  $[(T_i - T_0)/(C - T_0)] \cdot 100 = 50$ , де концентрація ліків призводила до 50% зниження зростання загального протеїну (визначеного шляхом фарбування СРБ) у контрольних клітинах під час інкубації з ліками. Концентрацію ліків, яка призводить до повного пригнічення росту (TGI) розраховували з  $T_i = T_0$ . Концентрацію LC<sub>50</sub> (концентрацію ліків, яка приводить до 50% зменшення визначеного білка наприкінці обробки ліками в порівнянні з початком), що вказує загальну втрату клітин після лікування, розраховували з  $[(T_i - T_0)/T_0] \cdot 100 = -50$ .

Клітинні лінії із множинною фармакологічною резистентністю серед 60 панелей клітинних ліній були ідентифіковані NCI як клітинні лінії з високим вмістом P-гр, як було визначено за виходом родаміну В (Lee et al., 1994) і ПЦР-визначенням mPNC для *mdr-1* (Alvarez et al., 1995).

#### Фармакокінетичний аналіз - Протокол 1.

Аналізовані речовини готували в розчині, який складається з 4% етанолу, 5% Tween 20, 5% поліетиленгліколю 400 в 0,15 М NaCl. Окремі дози 10 мг/кг п/о або 3 мг/кг в/в вводили в групах мишей-самок CD1 (3 миші на кожную сполуку на одиницю часу). В 0 хв, 4 хв, 15 хв, 1 годину, 4 години та 24 години мишей з цих груп забивали, і кров і головний мозок брали в кожній миші для подальших аналізів.

Зразки головного мозку миттєво заморожували в рідкому азоті та зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Мінімум 0,2 мл цільної крові від кожної тварини збирали в пробірку, яка містить етилен-діамін-тетраоцтову кислоту (ЕДТА) як антикоагулянт, ретельно перемішували, і зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Фармакокінетичний аналіз - Протокол 2.

Для того щоб приготувати дозований розчин, 5 мг аналізованої сполуки розчиняли в 100 мкл етанолу, створюючи розчин сполуки з концентрацією 50 мг/мл. Потім розчин розбавляли до 2 мг/мл, додаючи приблизно 2,4 мл 0,15M NaCl (0,9% в/о розчин), 5% о/о Tween 20 і 5% о/о ПЕГ 400 (кінцева концентрація етанолу 4% о/о).

Окремі дози аналізованої сполуки по 10 мг/кг п/о або по 2 мг/кг в/в вводили в групах з 3 мишей-самок лінії Balb C. На 5 хвилині, 15 хв, 60 хв, 4 години, 8 годин і 24 години мишей з цих груп забивали, і зразки цільної крові приблизно по 0,2 мл вносили в ЕДТА для одержання кінцевої концентрації 0, 5 мМ, додатково відбирали головний мозок. Як цільну кров, так і головний мозок миттєво заморожували в рідкому азоті та зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  до відправлення на твердому діоксиді вуглецю на аналіз.

Аналіз зразків фармакокінетичного дослідження:

Аналіз виконували в ASI Limited (Медична школа госпіталю Сент-Джордж, Лондон). Концентрацію аналізованої речовини в отриманих зразках крові та головного мозку визначали методом ВЕРХ із МС-детекцією. Контрольні, вільні від аналізованої речовини зразки крові були отримані від Harian Sera-Lab Limited (Лонгборо, Англія). Зразки головного мозку нульового часу були використані як контрольні, вільні від аналізованої сполуки.

Приготування зразків головного мозку:

По одній півкулі з кожного головного мозку гомогенізували в 5 мл води.

Екстракція зразків

Контрольні або аналізовані зразки головного мозку або крові мишей (0,05 мкл), внутрішній стандартний розчин (0,1 мл), 5% розчин сульфату цинку (0,5 мл) і ацетон (0,5 мл) додавали за допомогою піпетки в 2 мл поліпропіленові пробірки (Sarstedt Limited, Beaumont Leys, Лейчестер, Великобританія), і змішували протягом як мінімум 5 хвилин (на міксері IKA-Vibrax-VXR, Merk (BDH) Limited, Пул Дорсет, Великобританія). Потім пробірки центрифугували на мікроцентрифузі як мінімум 2 хвилини. Шар розчинника зливали декантацією в 4,5 мл поліпропіленові пробірки, які містять гідроксид натрію (0,1 M, 0,1 мл) і метил-трет-бутиловий ефір (МТБЕ, 2 мл). Потім пробірки перемішували як мінімум 5 хвилин (на міксері IKA-Vibrax-VXR) і центрифугували при 3500 об./хв. протягом 5 хвилин. Шар розчинника потім перенесли в 4,5 мл конічні поліпропіленові пробірки, поміщали в SpeedVac® і випарювали до сухого стану.

Висушені екстракти розчиняли 0,15 мл 80% метанолу та перемішували протягом як мінімум 5 хвилин (на міксері IKA-Vibrax-VXR), і центрифугували при 3500 об./хв. протягом 5 хвилин. Екстракт переносили в пробірки для автоматичного відбору

проби (NLG Analytical, Adelphi Mill, Bollington, Чешир, Великобританія) і поміщали в штатив для автоматичного відбору проби, який зберігали за кімнатної температури. Пристрій для автовідбору проби програмували для введення по 0,03 мл аліквот кожного з екстрактів на аналітичний стовпчик.

Приклад 1. Ферментація та виділення аналізованих з'єднань.

1.1. Ферментація та виділення 39-дезметоксирапаміцину

39-дезметоксирапаміцин одержували від зростаючих культур *S.hygrosopicus* MG2-10 [IJMNOQLhis] і постачали циклогексан-карбоксильною кислотою (ЦГКК), як це описано нижче.

*S.hygrosopicus* MG2-10 [IJMNOQLhis] одержували введенням до MG2-10 штаму, описаного в WO 2004/007709 плазмиди, яка містить гени *gapI*, *gapJ*, *gapM*, *gapN*, *gapO*, *gapQ* і *gapL*. Касету генів конструювали з геном *gapL*, який містить 5' внутрішньорамкову гістидінову мітку. Як описано в WO 2004/007709, плазміда також містила джерело переносу та маркер стійкості апраміцину для трансформції MG2-10 шляхом кон'югації та селекції екскон'югантів, і ділянка для прикріплення *phiBT1* для сайт-специфічної інтеграції в хромосому. Виділення кожного із цих генів, і метод, який використовується для конструкції касет генів, що містять комбінації пост-PKS генів, виконували, як описано в WO 2004/007709.

Рідкі культури.

Вегетативні культури *S.hygrosopicus* MG2-10 культивували, як описано в Матеріалах і Методах. Продукуючі культури інокулювали з вегетативними культурами по 0,5 мл в 7 мл середовища 3 в 50 мл пробірки. Культивування проводили протягом 7 днів, при  $26^{\circ}\text{C}$ , 300 об./хв. Зразки по 1 мл екстрагували 1:1 ацетонітрилом при струшуванні протягом 30 хв., центрифугували 10 хв., 13000 об./хв., і аналізували та розраховували відповідно до Методу В аналізу (див. Матеріали та Методи). Підтвердження продукту проводили мас-спектрометрією з використанням Методу С аналізу (див. Матеріали та Методи).

Аналог рапаміцину, який спостерігався, як передбачалося, виявився бажаним 39-дезметоксирапаміцином, на основі аналітичних даних, описаних при характеристиці нижче.

Ферментація

Первинну вегетативну культуру *S.hygrosopicus* MG2-10 [IJMNOQLhis] на середовищі 4 культивували в основному так, як описано в Матеріалах і Методах. Вторинну вегетативну культуру в середовищі 4 інокулювали при 10% о/о,  $28^{\circ}\text{C}$ , 250 об./хв., протягом 24 годин. Вегетативні культури інокулювали при 5% о/о на середовище 5 (див. Матеріали та Методи) в 20 л ферментер. Культивування проводили протягом 3 днів при  $26^{\circ}\text{C}$ , 0,5 vvm.  $\geq 30\%$  розчиненого кисню підтримували шляхом зміни дугової швидкості імеллера, мінімальна дугова швидкість 1,18 м/с, максимальна дугова швидкість 2,75 м/с. Додавання циклогексан-карбоксильної кислоти виконували на 24 і 48 годину після інокуляції, щоб одержати кінцеву концентрацію 2 мм.

#### Екстракція та очищення

Ферментаційний бульйон (30 л) перемішували з рівним об'ємом метанолу протягом 2 годин, а потім центрифугували, щоб осадити клітини (10 хв, 3500 об./хв.). Надосадову рідину перемішували зі смолою Dianon®HP20 (43 г/л) протягом 1 години, потім фільтрували. Смола відмивали батч-методом за допомогою ацетону, щоб відокремити аналог рапаміцину, і видаляли розчинник вакуумом. Водний концентрат потім розбавляли водою до 2 л і екстрагували етилацетатом (3 × 2 л). Розчинник видаляли вакуумом до одержання коричневої олії (20,5 г).

Екстракт розчиняли в ацетоні, висушували кварцом, наносили на кварцеву колонку (6 × 6,5 см діаметр) і елюювали східчастим градієнтом ацетон/гексану (20%-40%). Збирали фракції, які містять аналог рапаміцину, і видаляли розчинник вакуумом. Осад (2,6 г) далі хроматографували (в 3 партіях) на Sephadex LH20, елюючи сумішшю хлороформ/гептан/етанол 10:10:1. Частково очищений аналог рапаміцину (1,7 г) очищали обернено-фазовою (C18) препаративною ВЕРХ із використанням Gilson HPLC, елюючи колонкові Phenomenex 21,2 250 мм Luna 5 MCM C18 BDS зі швидкістю 21 мл/хв. сумішшю 65% ацетонітрил/вода. Поєднували найбільш очищені фракції (визначені аналітичною ВЕРХ, Метод В), і видаляли розчинник у вакуумі для одержання 39-дезметоксирапаміцину (563 мг).

#### Характеристика

<sup>1</sup>H ЯМР-спектр 39-дезметоксирапаміцину був еквівалентний до стандартного (P.Lowden, Ph.D., Dissertation, University of Cambridge, 1997).

PX-MC і PX-MC<sup>n</sup>-аналіз екстрактів культур показав, що відношення m/z аналога рапаміцину на 30 а.е.м. менше, ніж для рапаміцину, що відповідає відсутності метокси-групи. Іони, які спостерігались: [M-H]<sup>-</sup> 882.3, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 901.4, [M+Na]<sup>+</sup> 906.2, [M+K]<sup>+</sup> 922.2. Фрагментація натрієвого похідного дала прогнозовані іони для 39-дезметоксирапаміцину після раніше визначеного шляху фрагментації (Fig. 2) (J.A. Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000). Ці дані мас-спектрометрії з фрагментації звузили область аналогів рапаміцину, де мала місце втрата метокси-групи, до фрагмента C28-C42, який містить циклогексильну послідовність.

Дані мас-спектрометрії з фрагментації повністю відповідають структурі 39-дезметоксирапаміцину.

#### 1.2. Ферментація та виділення 27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину

27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцин одержували від зростаючих культур *S.hygrosopicus* MG2-10 [JMNOLhis] і постачали циклогексанкарбоксильною кислотою (ЦГКК), як це описано нижче.

*S.hygrosopicus* MG2-10 [JMNOLhis] одержували введенням в MG2-10 штам, описаний в WO 2004/007709 плазмиди, яка містить гени *garJ*, *garM*, *garN*, *garO* і *garL*. Касету генів конструювали з геном *garL*, який містить 5' внутрішньорамкову гістидинову мітку. Як описано в WO 2004/007709, плазміда також містила джерело переносу та маркер

стійкості апраміцину для трансформації MG2-10 шляхом кон'югації та селекції екскон'югантів, і ділянку для прикріплення *phiBT1* для сайт-специфічної інтеграції в хромосому. Виділення кожного із цих генів, і метод, який використовується для конструкції касет генів, які містять комбінації пост-PKS генів, виконували, як описано в WO 2004/007709.

#### Рідкі культури.

Веgetативні культури *S.hygrosopicus* MG2-10 [JMNOLhis] культивували, як описано в Матеріалах і Методах. Продукуючі культури інокулювали з вегетативними культурами по 0,5 мл в 7 мл середовища 3 в 50 мл пробірки. Культивування проводили протягом 7 днів, при 26°C, 300 об./хв. Зразки по 1 мл екстрагували 1:1 ацетонітрилом при струшуванні протягом 30 хв., центрифугували 10 хв., 13000 об./хв., і аналізували та розраховували відповідно до Методу В аналізу (див. Матеріали та Методи). Підтвердження продукту проводили мас-спектрометрією з використанням Методу С аналізу (див. Матеріали та Методи).

Аналог рапаміцину, який спостерігався, як передбачалося, виявився бажаним 39-дезметоксирапаміцином, на основі аналітичних даних, описаних при характеристиці нижче.

#### Ферментація

Первинну вегетативну культуру *S.hygrosopicus* MG2-10 [JMNOLhis] на середовищі 2 культивували в основному так, як описано в Матеріалах і Методах. Вторинну вегетативну культуру в середовищі 2 інокулювали при 10% о/о, 28°C, 250 об./хв., протягом 24 годин. Веgetативні культури інокулювали при 10% о/о на середовищі 5 (див. Матеріали та Методи) в 20 л ферментер. Культивування проводили протягом 6 днів при 26°C, 0,75 vvm. ≥ 30% розчиненого кисню підтримували шляхом зміни дугової швидкості імпелера, мінімальна дугова швидкість 1,18 м/с, максимальна дугова швидкість 2,75 м/с. Додавання циклогексанкарбоксильної кислоти виконували на 24 і 48 годину після інокуляції, щоб одержати кінцеву концентрацію 2 мм.

#### Екстракція та очищення

Ферментаційний бульйон (15 л) перемішували з рівним за об'ємом метанолом протягом 2 годин, а потім центрифугували, щоб осадити клітини (10 хв., 3500 об./хв.). Надосадову рідину перемішували зі смолою Dianon®HP20 (43 г/л) протягом 1 години, потім фільтрували. Смола відмивали батч-методом за допомогою ацетону, щоб відокремити аналог рапаміцину, і видаляли розчинник вакуумом. Водний концентрат потім розбавляли водою до 2 л і екстрагували етилацетатом (3 × 2 л). Розчинник видаляли вакуумом до одержання коричневої олії (12 г).

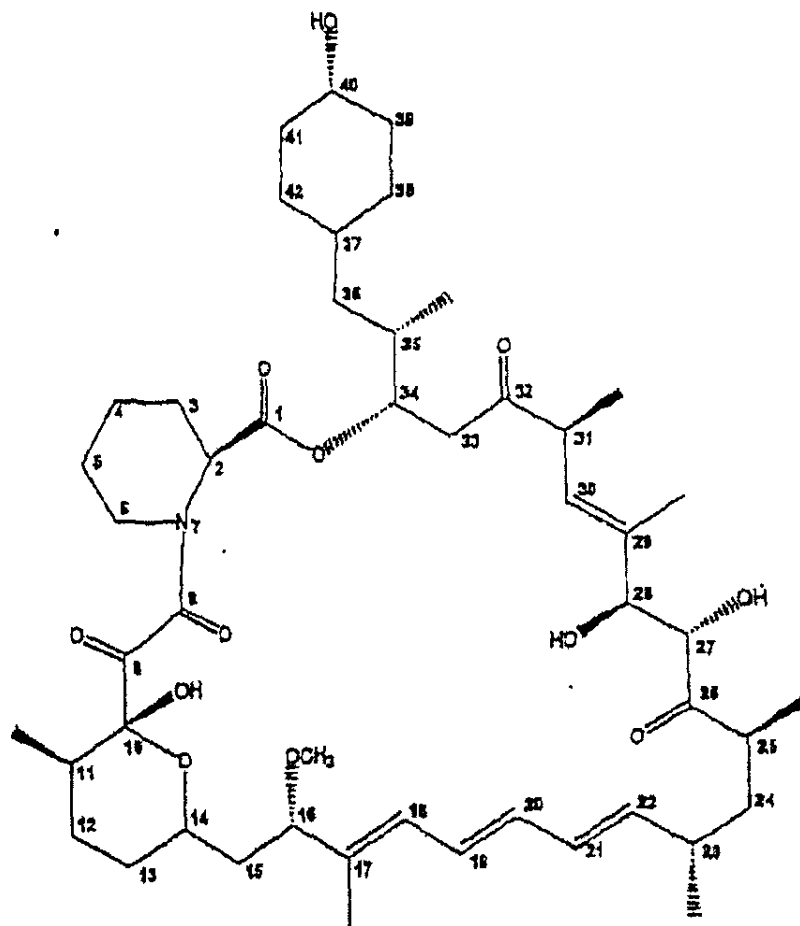
Екстракт розчиняли в ацетоні, висушували кварцом, наносили на кварцеву колонку (4 × 6,5 см діаметр) і елюювали східчастим градієнтом ацетон/гексана (20%-40%). Збирали фракції, які містять аналог рапаміцину, і видаляли розчинник вакуумом. Осад (0,203 г) збагачували обернено-фазовою (C18) препаративною ВЕРХ із використанням Gilson HPLC, елюючи колонкові Phenomenex 21,2 250 мм Luna 5 мкм C18 BDS зі

швидкістю 21 мл/хв. сумішшю 65% ацетонітрил/вода. Поєднували найбільш очищені фракції (визначені аналітичною ВЕРХ, Метод В), і видаляли розчинник у вакуумі для одержання осаду (25,8 мг). Осад очищали обернено-фазовою (С18) препаративною ВЕРХ із використанням Gilson HPLC, елюючи колонкові Hypersil 4,6 × 150 мм 3 мкм С18 BDS зі швидкістю 1 мл/хв. сумішшю 60%

ацетонітрил/вода. Поєднували найбільш очищені фракції (визначені аналітичною ВЕРХ, Метод В), і видаляли розчинник у вакуумі для одержання 27-О-дезметил-39-дезметоксипапіцину (19,9 мг).

#### Характеристика

<sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектри узгоджуються зі структурою 27-О-дезметил-39-дезметоксипапіцину, розподіл показаний у таблиці 3.



Таблиця 3. Дані ЯМР для 27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину в CDCl<sub>3</sub> при 500 МГц для <sup>1</sup>H-ЯМР і 125 для <sup>13</sup>C-ЯМР.

Положення	<sup>1</sup> H-ЯМР			<sup>13</sup> C-ЯМР,	
	δ частин/ млн.	Множинність, Гц	COSY	δ частин/ млн.	НМВС кореляції Н та <sup>13</sup> C
1	-	-		169,3	-
2	5,21	br. d, 5	H-3	51,3	C-1, C-3, C-4, C-6 і C-8
3	2,30	m, complex	H-2, H-4	27,0	C-1, C-2, C-4 і C-5
4	1,78 1,43	m, complex m, complex	H-3, H-5	20,7	C-2, C-3, C-5, і C-6
5	1,67 1,36	m, complex m, complex	H-4, H-6	25,1	C-3, C-4, і C-6
6	3,50 3,30	ddd, 16, 10,5 5 ddd, 16, 9,5, 6	H-5	46,3	C-2, C-4, C-5, і C-8
7	-	-		N	-
8	-	-		166,5	-
9	-	-		194,2	-
10	-	-		98,5	-
11	2,02	m, complex	H-11CH <sub>3</sub> H-12	32,0	C-9, C-10, C-12, C-13 і 11-CH <sub>3</sub>
11-CH <sub>3</sub>	0,91	d, 6,5	H-11	16,0	C-10, C-11 і C-12
12	1,61	m, complex	H-11, H-13	26,8	C-10, C-11, C-13, C-14 і 11-CH <sub>3</sub>
13	1,66 1,43	m, complex m, complex	H-12, H-14	30,5	C-1, C-3, C-4, C-6 і C-8
14	3,95	m, complex	H-13, H-15	70,8	C-11, C-12, C-14 і C-15
15	1,83 1,44	m, complex m, complex	H-14, H-16	35,1	C-13, C-14, C-16 і C-17
16	4,11	dd, 5,5, 5,5	H-15	83,6	C-1, C-3, C-4, C-6 і C-8
16-OCH <sub>3</sub>	3,11	br.s	-	55,9	C-16, C-15 і C-17
17	-	-	-	135,6	-
17-CH <sub>3</sub>	1,77	s	-	13,3	C-16, C-17 і C-18
18	6.09	d, 11	H-19	130,1	C-16, C-17, C-19, C-20 і 17-CH <sub>3</sub>

19	6,35	dd, 14,5, 11	H-18, H-20	126,8	C-17,C-18,C-20 i C-21
20	6,24	dd, 14,5, 10,5	H-19, H-21	132,8	C-18,C-19,C-21 и-22
21	5,99	dd, 15, 10,5	H-20, H-22	128,2	C-19,C-20,C-22 i C-23
22	5,48	dd, 15, 8	H-21.H- 23	137,0	C-20,3-21,C- 23,C-24 i 23-CH <sub>3</sub>
23	2,29	m, complex	H-22, 23- CH <sub>3</sub> , H- 24	35,2	C-21,C-22,C- 24,C-25 i 23-CH <sub>3</sub>
23-CH <sub>3</sub>	0,97	d, 6,5	H-23	21,0	C-22.C-23 i C- 24
24	1,87 1,16	m, complex m, complex	H-23, H-25	35,1	C-22,C-23,C- 25,C-26, 23-CH <sub>3</sub> i 25-CH <sub>3</sub>
25	2,52	m, complex	H-24, 25-CH <sub>3</sub>	40,7	C-23,C-24,C- 26,C-27 i 25-CH <sub>3</sub>
25-CH <sub>3</sub>	0,83	d, 6,5	H-25	14,0	C-24,C-25 i C- 26
26	-	-	-	214,9	-
27	3,97	d, 4	H-28	77,8	C-25,C-26,C- 28,C-29 i 27-OCH <sub>3</sub>
27-OH	3,32	s	-	0	C-27
28	4.34	d, 4	H-27	75,6	C-26,C-27,C- 29,C-30 i 29-CH <sub>3</sub>
29	-	-	-	138,9	-
29-CH <sub>3</sub>	1,66	s	-	13,9	C-28,C-29 i C- 30
30	5,39	d. 11	H-31	125,2	C-28,C-29,C- 31,C-32, 29-CH <sub>3</sub> i 31-CH <sub>3</sub>
31	3,62	dq, 11, 6,5	H-30, 31- CH <sub>3</sub>	44,2	C-29,C-30,C- 32,C-33 i 31-CH <sub>3</sub>
31-CH <sub>3</sub>	1,00	d, 6,5	H-31	15,8	C-30,C-31 i C- 32
32	-	-	-	208,4	-
33	2,70 2,52	dd, 17,5, 5,5 dd, 17,5, 4	H-34	40,5	C-31,C-32,C-34 i C-35
34	5,10	ddd, 7, 5,5, 4	H-33, H-35	67,3	C-1,C-32,C- 33,C-35, C-36 i 35-CH <sub>3</sub>
35	1,90	m, complex	H-34, 35- 2H <sub>3</sub> , H- 36	34,1	C-33,C-34,C- 36,C-37 i 35-CH <sub>3</sub>

35-CH <sub>3</sub>	0,84	d, 6.5	H-35	15,2	C-34, C-35 i C-36
36	1,44	m, complex	H-35, H-37	39,6	C-34, C-35, C-37, C-38, C-42 i 35-CH <sub>3</sub>
	1,20	m, complex			
37	1.35	m, complex	complex	39,0	C-35, C-36, C-38, C-39, C-41 i C-42
38	1,46- 0,69	m, complex	complex	33,6*	-
39	1,46- 0,69	m, complex	complex	40,7	-
40	3,99	m, complex	complex	75,5	C-38, C-39, C-41 i C-42
41	1,46- 0,69	m, complex	complex	40,8	-
42	1,46- 0.69	m, complex	complex	33,6*	-

- \* Величини зазначені як подвійна інтеграція при порівнянні з іншими <sup>13</sup>C-Величинами в <sup>13</sup>C-ЯМР спектрі.

- Стереохімія не була визначена, тому що нам було потрібно більше ЯМР-експериментів (таких як 1D і 2D NOESY), тому метиленовий аксіальний і екваторіальний <sup>1</sup>H не були визначені.

PX-MC і PX-MC<sup>n</sup>-аналіз екстрактів культур показав, що відношення m/z аналога рапаміцину на 44 а.е.м. менше, ніж для рапаміцину, що відповідає відсутності метил- і метокси-групи. Іони, які спостерігались: [M-H]<sup>-</sup> 868.7, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 887.8, [M+Na]<sup>+</sup> 892.8. Фрагментація натрієвого похідного дала прогнозовані іони для 27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину після раніше визначеного шляху фрагментації (Fig. 2) (J.A. Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000). Ці дані мас-спектрометрії з фрагментації звузили область аналогів рапаміцину, де мала місце втрата метокси-групи, до фрагмента C28-C42, який містить циклогексильну послідовність, і звузили область аналогів рапаміцину, де мала місце втрата 0-метил-групи, до фрагмента C15-C27.

Дані мас-спектрометрії з фрагментації повністю відповідають структурі 27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину.

1.3. Ферментація та виділення 16-О-дезметил-27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину

16-О-дезметил-27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцин одержували від зростаючих культур *S.hygroscopicus* MG2-10 [IJNOLhis] і поставляли циклогексан-карбоксільною кислотою (ЦГКК), як описано нижче.

*S.hygroscopicus* MG2-10 [IJNOLhis] одержували введенням в MG2-10 штам, описаний в WO 2004/007709 плазміді, яка містить гени *garI*, *garJ*, *garN*, *garO* і *garL*. Касету генів конструювали з геном *garL*, який містить 5' внутрішньорамкову гістидинову мітку. Як описано в WO 2004/007709, плазмід також містила джерело переносу та маркер стійкості апраміцину для трансформації MG2-10 шляхом кон'югації та селекції екскон'югантів, і ді-

лянку для прикріплення *phiBT1* для сайт-специфічної інтеграції в хромосому. Виділення кожного із цих генів, і метод, який використовується для конструкції касет генів, які містять комбінації пост-PKS генів, виконували, як описано в WO 2004/007709.

Рідкі культури.

Вегетативні культури *S.hygroscopicus* MG2-10 [IJNOLhis] культивували, як описано в Матеріалах і Методах. Продукуючі культури інокулювали з вегетативними культурами по 0,5 мл в 7 мл середовища 3 в 50 мл пробірки. Культивування проводили протягом 7 днів, при 26°C, 300 об./хв. Зразки по 1 мл екстрагували 1:1 ацетонітрилом при струшуванні протягом 30 хв, центрифугували 10 хв, 13000 об./хв., і аналізували та розраховували відповідно до Методу В аналізу (див. Матеріали та Методи). Підтвердження продукту проводили мас-спектрометрією з використанням Методу С аналізу (див. Матеріали та Методи).

Аналог рапаміцину, який спостерігався, як передбачалося, виявився бажаним 16-О-дезметил-27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцином, на підставі аналітичних даних, описаних при характеристиці нижче.

Ферментація

Первинну вегетативну культуру *S.hygroscopicus* MG2-10 [IJNOLhis] на середовищі 2 культивували в основному так, як описано в Матеріалах і Методах. Вторинну вегетативну культуру в середовищі 2 інокулювали при 10% о/о, 28°C, 250 об./хв., протягом 48 годин, і третинну культуру інокулювали при 10% о/о, 28°C, 250 об./хв., протягом 24 годин. Вегетативні культури інокулювали при 10% о/о на середовищі 5 (див. Матеріали та



Методи) в 3 × 7 л ферментери. Культивування проводили протягом 6 днів при 26°C, 0,75 vvm. ≥ 30% розчиненого кисню підтримували шляхом зміни дугової швидкості імелера, мінімальна дугова швидкість 0,94 м/с, максимальна дугова швидкість 1,88 м/с. Додавання циклогексан-карбоксильної кислоти виконували на 24 годину після інокуляції, щоб одержати кінцеву концентрацію 1 мМ. L-лізин додавали при t=0.

#### Екстракція та очищення

Ферментаційний бульйон (12 л) перемішували з рівним за об'ємом метанолом протягом 2 годин, а потім центрифугували, щоб осадити клітини (10 хв, 3500 об./хв.). Надосадову рідину перемішували зі смолою Diaion HP20 (43 г/л) протягом 1 години, потім фільтрували. Смоли відмивали батч-методом за допомогою ацетону, щоб відокремити аналог рапаміцину, і видаляли розчинник вакуумом. Водний концентрат потім розбавляли водою до 2 л і екстрагували етилацетатом (3 × 2 л). Розчинник видаляли вакуумом до одержання коричневої олії (8,75 г).

Екстракт розчиняли в ацетоні, висушували кварцом, наносили на кварцеву колонку (4 × 6,5 см діаметр) і елюювали східчастим градієнтом ацетон/гексану (20%-40%). Збирали фракції, які містять аналог рапаміцину, і видаляли розчинник вакуумом. Осад (0,488 г) далі хроматографували (у трьох батчах) на Sephadex LH20, елюючи сумішшю хлороформ/гептан/етанол 10:10:1. Поєднували фракції, які містять аналог рапаміцину, і видаляли розчинник вакуумом. Частково очищений аналог рапаміцину (162 мг) очищали обернено-фазовою (C18) препаративною ВЕРХ із використанням Gilson HPLC, елюючи колонкові Phenomenex 21,2 × 250 мм Luna 5 мкм C18 BDS зі швидкістю 21 мл/хв. сумішшю 65% ацетонітрил/вода. Поєднували найбільш очищені фракції (визначені аналітичною ВЕРХ, Метод В), і видаляли розчинник у вакуумі для одержання 16-О-

дезметил-27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину (44,7 мг).

#### Характеристика

PX-MC і PX-MC<sup>n</sup>-аналіз екстрактів культур показав присутність нового аналога рапаміцину, який елюється набагато раніше всіх інших аналогів 39-дезметоксирапаміцину. Відношення m/z для різних іонів аналога рапаміцину на 58 а.е.м. є меншим, ніж для рапаміцину, що відповідає відсутності двох О-метильних і метокси-групи. Іони, які спостерігаються: [M-H]<sup>-</sup> 854.7, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 877.8, [M+Na]<sup>+</sup> 892.7, [M+K]<sup>+</sup> 908.8. Фрагментація натрієвого похідного дала прогнозовані іони для 16-О-дезметил-27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину після раніше визначеного шляху фрагментації (Fig. 2) (J.A. Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000). Ці дані мас-спектрометрії з фрагментації звузили область аналогів рапаміцину, де мала місце втрата метокси-групи, до фрагмента C28-C42, який містить циклогексильну послідовність, і звузили область аналогів рапаміцину, де мала місце втрата О-метильних груп, до фрагмента C15-C27. Дані ЯМР та мас-спектрометрії з фрагментації повністю відповідають структурі 16-О-дезметил-27-О-дезметил-39-дезметоксирапаміцину.

Приклад 2. Біоаналіз in vitro протипухлинної активності

Визначення in vitro протипухлинної активності 39-дезметоксирапаміцину

Визначення in vitro протипухлинної активності 39-дезметоксирапаміцину на панелі з 12 людських пухлинних клітинних ліній у моношаровому проліфераційному тесті проводили, як описано в Протоколі 1 у наведених вище методах, з використанням модифікованого пропідіум-йодидного тесту.

Результати відображені в таблиці 4 нижче, кожний результат є середнім від подвійних експериментів. Таблиця 5 показує IC<sub>50</sub> та IC<sub>70</sub> для сполук і рапаміцину серед аналізованих клітинних ліній.

Таблиця 4

Клітинна лінія	Тест/контроль (%) та концентрація речовини			
	Рапаміцин		39-дезметоксирапаміцин	
	1 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	10 мкМ
SF268	53.5	46	57.5	23
251L	75.5	40	86	32.5
H460	67	66	71	55.5
MCF-7	68.5	26.5	92.5	18.5
MDA231	67	63.5	68	37.5
MDA4 68	56.5	32	65	13.5
394NL	45	44	48	40.5
QVCAR3	69	69.5	77.5	62
DU145	50.5	54	65.5	44.5
LNCAP	61	34	74.5	28.5
A498	58.5	48.5	62.5	43.5
1138L	42	21.5	52	9.5

Таблиця 5

	Рапаміцин	39-дезметоксирапаміцин
Середнє IC <sub>50</sub> (мікроМ)	3.5	3.25
Середнє IC <sub>70</sub> (мікроМ)	9.1	6.95

Визначення *in vitro* протипухлинної активності 39-дезметоксирапаміцину, селективної у відношенні мульти-фармакологічної резистентності

Визначення *in vitro* селективної МФР протипухлинної активності 39-дезметоксирапаміцину на панелі клітинної лінії NCI 60 з людських пухлинних

клітинних ліній у моношаровому проліфераційному тесті проводили, як описано в Протоколі 2, Матеріали та методи, з використанням тесту, заснованого на SRB тесті. Результати аналізу відображені в таблиці 6 нижче:

Таблиця 6

Активність *in vitro* проти високо-МФР-експресуючих клітинних ліній

Сполука	Log GI <sub>50</sub>				
	NSCLC HOP-62	Кишковик SW-620	ЦНС SF295	Нирки A498	Нирки UO-31
39-дезметоксирапаміцин	-8.3	-8.3	-5.85	-7.07	-8.3
Рапаміцин	-6.63	-4.60	-7.0	-6.60	-7.0

Можна бачити, що за винятком однієї клітинної лінії, 39-дезметоксирапаміцин демонструє однаково або кращу активність проти високо-МФР-експресуючих клітинних ліній, у порівнянні з рапаміцином.

Приклад 3. *In vitro* APME аналіз

Аналіз проникності Caco-2

Caco-2 клітини, які зливаються (Li, A.P., 1992, Volpe, D.A., et al., 2001) в 24-комірковому форматі Corning Costar Transwell одержували від In Vitro Technologies Inc. (IVT Inc., Балтімор, Меріленд, США). Апікальна камера містила 0,15 мл FADлансованого буферного розчину Хенкса (HBBS) pH 7,4, 1% ДМСО, 0,1 мМ люцифера жовтого. Базальна камера містила 0,6 мл HBBS, pH 7,4, 1% ДМСО. Контрольні та аналізовані зразки інкубували при 37°C у зволоженому інкубаторі, струшуючи з швидкістю 130 об./хв. протягом 1 години. Люцифер жовтий проникає тільки парацелюлярним шляхом (між тісними зв'язками), висока ефективна проникність (P<sub>app</sub>) для люцифера жовтого свідчить про клітинне ушкодження під час тесту, і всі такі комірки відкидали. Як референсну сполуку використовували пропанол (гарна пасивна проникність із невідомими ефектами транспортерів) та ацебутолол (погана пасивна проникність, ослаблена активним виведенням через Р-глікопротеїн). Сполуки аналізували в одно- та двокоординатному форматі, вносячи сполуки в апікальну і базальну камери (по 0,01 мМ). Сполуки в апікальній та базальній камері аналізували методом ВЕРХ-МС (Метод А, див. Матеріали та Методи). Результати виражали у вигляді ефективної

проникності, P<sub>app</sub>, (нм/с) та у вигляді коефіцієнта потоку (А до В проти В до А).

$$P_{app}(\text{нм/с}) = \frac{\text{Об'єм акцептора}}{\text{Площа [донора]}} \times \frac{\Delta[\text{акцептора}]}{\Delta\text{час}}$$

Об'єм акцептора: 0,6 мл (А>В) та 0,15 мл (В>А)

Площа моношару: 0,33 см<sup>2</sup>

Дчас: 60 хв

Позитивне значення коефіцієнта потоку вказує на активний вихід з апікальної поверхні клітин.

Аналіз стабільності мікросом печінки людини (ЛПМ)

Гомогенати печінки дозволяють оцінювати властиву сполукам схильність дії ферментів І фази (окисної), включаючи цитохроми CYP450 (наприклад, CYP2c8, CYP2D6, CYP1A, CYP3A4, CYP2E1), естерази, амідази та флавін-монооксигенази (ФМО).

Визначали час напів-життя (T<sub>1/2</sub>) аналізованих сполук, при впливі мікросом печінки людини, контролюючи їхнє зникнення протягом часу за допомогою РХ-МС. Сполуки при 0,01 мМ інкубували протягом 40 хв при 37°C, 0,1М Трис-НСІ, pH 7,4 із субклітинною фракцією мікросом печінки людини при концентрації білка 0,25 мг/мл і рівнем, який насичує, НАДРН як кофактор. Після закінчення проміжків часу, до аналізованих зразків додавали ацетонітрil, щоб осадити білок і зупинити метаболізм. Зразки центрифугували та аналізували на вміст вихідної сполуки з використанням аналітичного Методу А (див. Матеріали та Методи).

Таблиця 7

## Результати In vitro ADME-аналізу

Тест	Сполука			
	Рапаміцин	39-дезметокси-рапаміцин	16-О-десметил-27-О-десметил-39-дезметокси-рапаміцин	27-О-десметил-39-дезметокси-рапаміцин
Сасо-2: P <sub>app</sub> (нм/с)	2	29	13	4
Коефіцієнт джерела	458	15	37	91
Стабільність ЛПМ: TS, хв	40	59	47	27

Приклад 4. Аналізи зв'язування m vitro  
FKBP12

FKBP12 обернено розгортається в хімічному денатуранті гуанідин-гідрохлориді (ГдНCl), і розгортання може бути відстежено за зміною власної флуоресценції білка (Main et al., 1998). Ліганди, які специфічно зв'язують і стабілізують нативний стан FKBP12, змінюють криву денатурації таким чином, що білок розгортається при більш високих концентраціях хімічного денатуранта (Main et al., 1999). За розходженням стабільності може бути визначена константа зв'язування ліганда з використанням рівняння 1.

$$\Delta G_{app} = \Delta G_{D-N}^{H_2O} + RT \ln \left( 1 + \frac{[L]}{K_d} \right) \quad (1)$$

де  $\Delta G_{app}$  - ефективне розходження вільної енергії розгортання між вільною та ліганд-зв'язаною формою,  $\Delta G_{D-N}^{H_2O}$  - вільна енергія розгортання вільного білка у воді,  $[L]$  - концентрація ліганда,  $K_d$  - константа дисоціації комплексу білок-ліганд (Meiering et al., 1992). Вільна енергія розгортання може бути зв'язана із середньою точкою переходу розгортання з використанням наступного рівняння:

$$\Delta G_{D-N}^{H_2O} = m_{D-N} [D]_{50\%} \quad (2)$$

де  $m_{D-N}$  - є константою для даного денатуранта та пропорційна зміні ступеня впливу залишків на розгортання (Tanford 1968 and Tanford 1970), а  $[D]_{50\%}$  є концентрацією денатуранта, яка відповідає середній точці розгортання. Ми визначаємо  $\Delta \Delta G_{D-N}^L$ , розходження стабільності FKBP12 з рапаміцином та невідомим лігандом (за тієї ж самої концентрації ліганда), як:

$$\Delta \Delta G_{D-N}^L = m_{D-N} > \Delta [D]_{50\%} \quad (3)$$

де  $m_{D-N}$  є середньою m-величиною переходу розгортання, а  $\Delta [D]_{50\%}$  - розходженням середніх точок для переходу розгортання рапаміцин-FKBP12 та переходу розгортання комплексу невідомий ліганд-FKBP12. За умов, коли  $[L] > K_d$ , тоді  $\Delta \Delta G_{D-N}$  може бути пов'язане з відносними  $K_d$  двох сполук через рівняння 4:

$$\Delta \Delta G_{D-N}^L = RT \ln \frac{K_d^X}{K_d^{rap}} \quad (4)$$

де  $K_d^{rap}$  є константою дисоціації рапаміцину, а  $K_d^X$  - константою дисоціації невідомого ліганда X. Таким чином,

$$K_d^X = K_d^{rap} \exp \left( \frac{m_{D-N} > \Delta [D]_{50\%}}{RT} \right) \quad (5)$$

Для визначення  $K_d$  для 39-дезметоксирапаміцину криву денатурації пристосували для одержання величин  $m_{D-N}$  та  $[D]_{50\%}$ , які були використані для розрахунку середньої m-величини,  $<m_{D-N}>$ , та  $[D]_{50\%}$ , і звідси  $K_d^X$ . Використовували значення  $K_d^X$  0,2 нМ, наявне в літературі.

Таблиця 8

## Результати аналізу зв'язування FKBP12 і in vitro

	FKBP12 $K_d$ (нМ)
Рапаміцин	0,2
39-дезметоксирапаміцин	0,7
27-О-десметил-39-дезметоксирапаміцин	0,8
16-О-десметил-27-О-десметил-39-дезметоксирапаміцин	101
39-дезметоксирапаміцин	160

## mTOR

Інгібування mTOR може бути встановлене опосередковано шляхом визначення рівня фосфорильовання сурогатних маркерів mTOR-шляху та p70S 6-кінази і S6 (Brunn et al., 1997; Mothe-Satney et al., 2000; Tee and Proud, 2002; Huang and Houghton, 2002).

Клітини HEK2 93 ко-трансфектували FLAG-мічених mTOR та мус-міченим Raptor, культивували 24 години, потім обробляли сироваткою протягом ночі. Клітини стимулювали 100 нМ інсуліну, потім збирали та лізували за допомогою 3 циклів заморожування/відтавання. Лізати поєднували, і рівні кількості піддавали імунопреципітації FLAG-антитілами до mTOR/Raptor-комплексу. Потім переробляли імунопреципітати: зразки, оброблені сполукою (від 0,00001 до 0,003 мМ) попередньо інкубували протягом 30 хвилин при 30°C з FKBP12/рапаміцином, FKBP12/39-дезметоксирапаміцином або з розчином (ДМСО), не-оброблені зразки інкубували в кіназному буфері. Імунопреципітати потім піддавали кіназному аналізу in vitro у присутності 3 мМ АТФ, 10 мМ Mn2+ та GST-4E-BP1 як субстрат. Реакції зупиняли з 4x-зразковим буферним розчином, потім піддавали 15% SDS-ПАГЕ, переносили вологим способом на PVDF-мембрану, потім досліджували на фосфо-4E-BP1 (T37/46).

Додатково, HEK293 клітини поміщали в 6-коміркові планшети і попередньо інкубували протягом 24 годин, і потім обробляли сироваткою протягом ночі. Потім клітини попередньо обробляли розчином або сполукою протягом 30 хв при 30°C, потім стимулювали 100 нМ інсуліном протягом 30 хвилин при 30°C та лізували трьома циклами заморожування/відтавання, і визначали в них концентрацію білка. Рівні кількості білка були внесені і розділені на SDS-ПАЕФ-гелях. Потім білок перенесли вологим способом на PVDF-мембрану і досліджували на фосфо-S6 (S3235/36) або фосфо-p70 S6K(T389).

Результати цих експериментів узагальнені на Фіг. 3.

Приклад 5: P-гр-субстратний аналіз in vitro  
Клітинні лінії

Обидві клітинні лінії, використані у даному дослідженні (MACL MCF7 та MACL MCF7 ADR) були отримані в National Cancer Institute, США.

Клітини рутинно пасирували один-два рази на тиждень. У культурі їх підтримували не більше 20 пасажів. Всі клітини вирощували при 37°C у зволоженої атмосфері (95% повітря, 5% CO<sub>2</sub>) у середовищі RPMI 1640 (PAA, Кельбе, Німеччина) з додаванням 5% ембріональної телячої сироватки (PAA, Кельбе, Німеччина) та 0,1% гентаміцину (PAA, Кельбе, Німеччина).

Протокол аналізу

Для того щоб оцінити ефекти 39-дезметоксирапаміцину, використовували модифікований пропідіум-йодидний аналіз, заснований на протоколі 1, описаному вище (Dengler et al., 1995). Коротко кажучи, клітини збирали з експоненціально-фазових культур за допомогою трипсинізації, підраховували і розміщували в 96-коміркові плоскодонні планшети з щільністю клітин 5 000 клітин на комірку. Після витримання протягом 24 годин для відновлення експонентного росту клітин, до клітин додавали 0,01 мл верапамілу в концентрації 0,18 мг/мл, або 0,01 мл культурального середовища, для одержання кінцевої концентрації верапамілу в комірках 0,01 мг/мл. У попередніх експериментах було встановлено, що ця концентрація є нетоксичною для клітин. Культуральне середовище, яке містить 39-дезметоксирапаміцин, таксол, або чисте культуральне середовище, додавали в кількості 0,01 мл на комірку. Сполуки вносили в трьох повторностях для 8 концентрацій з напівлогарифмічним кроком від 0,03 нМ до 10 нМ. Через 3 дні тривалого впливу ліків, середовище або середовище з речовиною заміняли 0,2 мл водні розчини пропідіум-йодиду (ПЙ) (7 мг/мл). Через те, що ПЙ проникає тільки крізь ушкоджені або лізовані мембрани, забарвлюється та вимірюється ДНК загіблених клітин, тоді як живі клітини не забарвлюються. Щоб визначити частку живих клітин, клітини пермеабілізували заморожуванням пластин, що приводить до загибелі всіх клітин. Після відтавання планшетів вимірювали флюоресценцію з використанням рідера мікропланшетів Sytofluor 4000 (збудження 530 нм, емісія 620 нм), показуючи пряме співвідношення до загального числа клітин.

Інгібування росту виражали як Тест/Контроль × 100 (%T/3). Результати аналізу враховувалися тільки в тому випадку, якщо позитивний контроль (таксол) індукував зміну інгібування росту пухлини в присутності та за відсутності верапамілу, і якщо контрольні клітини, оброблені розчином, мали інтенсивність флюоресценції >500.

Приготування аналізованих розчинів 39-дезметоксирапаміцину

Базовий розчин 3,3 мМ 39-дезметоксирапаміцину готували в ДМСО та зберігали при -20°C. Базовий розчин потім розморожували в день використання та зберігали за кімнатної температури до та під час дозування. Процедури розведення виконували з використанням середовища RPMI 1640, щоб одержати розчини кінцевої концентрацією, зменшеної в 18 разів.

Результати

На Фіг. 4 показані 4 графіки, які демонструють значення %T/C за всіх аналізованих концентрацій для паклітакселю (A та C) і 39-дезметоксирапаміцину (Y та D) у клітинних лініях з нормальним (A та B) і високим (C та D) рівнем експресії P-гр. Зафарбовані ромби представляють значення після застосування тільки паклітакселю або 39-дезметоксирапаміцину, не зафарбовані квадрати представляють значення після застосування паклітакселю або 39-дезметоксирапаміцину в присутності 0,01 мг/мл верапамілу (інгібітора P-гр).

Паклітаксель, відомий субстрат P-гр, демонструє зниження потужності при інгібуванні P-гр-експерсуючої пухлинної клітинної лінії MC7 ADR, і ця знижена потужність відновлюється при спільному застосуванні верапамілу, інгібітору P-гр (Фіг. 4A та 4C).

39-дезметоксирапаміцин не викликав значної зміни кривої проліферації P-гр-експерсуючої клітинної лінії MC7 ADR як з верапамілом, так і без нього (Фіг. 4B та 4D), що свідчило, про те що 39-дезметоксирапаміцин не є субстратом P-гр.

Приклад 6 - фармакокінетичний аналіз

6.1. РК-аналіз рапаміцину та 39-дезметоксирапаміцину

Фармакокінетичний аналіз із використанням стандартних методів, описаних вище, виконували для рапаміцину та 39-дезметоксирапаміцину, (протокол для кожної сполуки показаний у таблиці 9).

ППГ для кожної сполуки в крові та тканині головного мозку розраховували з використанням Kinetica 4/4 (InnaPhase Corporation), використовуючи не-компаратментальну модель і трапезоїдальний метод для розрахунку ППГ.

Коефіцієнт розподілу (Ri) для кожної сполуки після п/о та в/в введення розраховували, як зазначено нижче:

$$R_i = \frac{\text{ППГ}_{\text{мозку}}}{\text{ППГ}_{\text{крові}}}$$

Результати аналізу узагальнені в таблиці 9 поданій нижче та на Фіг. 5.

Таблиця 9

## Узагальнення фармакокінетичних даних

Сполуки	Протокол Рк	ППГ <sub>мозку</sub>		ППГ <sub>крові</sub>		Ri	
		п/о	в/в	п/о	в/в	п/о	в/в
Рапаміцин	2	1658,37	6338,11	25212,2	24876,5	0,066	0,255
39-дезметоксиратапаміцин	1	1697,69	24911,4	16856,5	15444,3	0,100	1,613

6.2 РК аналіз рапаміцину, дезметоксиратапаміцину та 27-О-десметил-39-дезметоксиратапаміцину

Фармакокінетичний аналіз із використанням стандартних методів, описаних вище, виконували для рапаміцину, 39-дезметоксиратапаміцину, і 27-О-десметил-39-дезметоксиратапаміцину (використовуючи Протокол 1, описаний вище).

ППГ для кожної сполуки в крові та тканині головного мозку розраховували з використанням

Kinetica 4/4 (InnaPhase Corporation), використовуючи не-компаратментальну модель і трапезоїдальний метод для розрахунку ППГ.

Коефіцієнт розподілу (Ri) для кожної сполуки після в/в введення розраховували як зазначено нижче:

$$Ri = \frac{ППГ_{мозку}}{ППГ_{крові}}$$

Таблиця 10

## Фармакокінетичні дані

Сполуки	ППГ <sub>мозку</sub> , в/в	ППГ <sub>крові</sub> , в/в	Ri, в/в
Рапаміцин	12156,6	10756,2	1,13
39-дезметоксиратапаміцин	15543,9	8017,88	1,94
27-О-десметил-39-дезметоксиратапаміцин	844005	1851,12	4,56

Приклад 7 - Активність на моделі експериментального алергійного енцефаломієліту (ЕАЕ) для розсіяного склерозу

Експериментальний алергійний енцефаломієліт (ЕАЕ) є аутоімунним запальним демієлінізуючим захворюванням центральної нервової системи (ЦНС), і вважається найкращим доступним аналогом розсіяного склерозу у тварин. Захворювання може бути викликане в генетично сприйнятливих тварин введенням цільного спинного мозку, або мієлінового основного протеїну (МОП) з повним ад'ювантом Фрейнда (ПАФ). Антиген-специфічні ефекторні клітини, які утягуються в ушкодження ЦНС, є CD4+ Т-лімфоцитами, рестриктованими з II класом головного комплексу пстосумісності (МНС). Нещодавно зростаюча увага була привернута до ролі цитокінів, таких як інтерлейкін-1 (ІЛ-1), фактори некрозу пухлин (ФНЛ) та інтерферони (ІФН), у запальних процесах. При активації антигеном, Т-клітини продукують деякі лімфокіни, які у випадку ЕАЕ можуть бути прямо або опосередковано відповідальні за ушкодження ЦНС. Лімфокинами, які, можливо, утягуються в патогенез ЕАЕ, є ІЛ-2, ІФНγ і ФНОβ. ІЛ-2 відіграє важливу роль в активації та проліферації Т-клітин, тоді як ІФНγ є потужним медіатором активації макрофагів. Крім того, ІФНγ індукує продукцію запальних цитокінів, таких як ІЛ-1, ФНО, а також експресію молекул II класу МНС, серед іншого, на ендотеліальних клітинах кров'яного русла в ЦНС, і на астроцитах, які, як вважається, відіграють важливу роль у презентації антигену енцефалітогенним Т-клітинам.

## 7.1 - Тварини та процедура імунізації

Пацюків-самців лінії Lewis у віці 8-10 тижнів утримували в стандартних лабораторних умовах (не вільних від специфічних патогенів) з вільним

доступом до їжі та води. ЕАЕ індукували однією ін'єкцією в основу хвоста 50 мл неповного ад'юванта Фрейнда (Difco, Детройт, Мічиган) плюс 50 мл сольового розчину, який містить 25 мг спинного мозку морських свинок та 1 мг Mycobacterium Tuberculosis, штам H 37 RA (Difco).

## 7.2 - Клінічна та гістологічна оцінка

Пацюків обстежували щодня шляхом аналізу маси тіла та клінічних ознак ЕАЕ до 30 днів після імунізації. Клінічну класифікацію проводив спостерігач, який не знав про імунізацію: 0= немає захворювання, 1= млявий хвіст, 2= помірний парепарез, 3= важкий парепарез, 4 = атональний стан, 5= загибель. Лікування захворювання визначали як повну відсутність клінічних симптомів і повернення до рухливості передімунізаційного періоду, у пацюків, у яких була визначена 0 ступінь протягом 5 наступних днів.

## 7.3 - Експериментальне лікування

Дослідні сполуки давали в різних дозах (5 або 15 мг/кг маси тіла) як у профілактичному, так і в лікувальному режимі. Для профілактичної частини дослідження лікування починали за 1 день до імунізації, а для лікувальної частини лікування починали на 7 день після імунізації (п/і). Як контрольну групу використовували пацюків, яким вводили розчинник за тих же самих експериментальних умов, профілактично або лікувально. Лікування проводили п/о щодня, шість разів на тиждень до 30 дня п/і. Як позитивний контроль використовували циклофосфамід.

Результати експерименту відображені на Фіг. 6 і в таблиці 11, поданій нижче. Фіг. 6А відображає ефект профілактичного режиму 39-дезметоксиратапаміцину при 5 та 15 мг/кг, Фіг. 6В відображає ефект лікувального режиму 39-

дезметоксирапаміцину при 5 та 15 мг/кг. Для кожного режиму показаний ефект 40 мг/кг циклофосфаміду як позитивного контролю. На обох графіках показане середнє значення для кожної групи. Можна бачити, що 39-дезметоксирапаміцин має однакову із циклофосфамідом ефективність на цій моделі, і що він не тільки знижує ступінь тяжкості

симптомів, але також зменшує тривалість епізоду. Потрібно відзначити, що через загибель 5 з 7 пацієнтів, які одержували розчинник, під час дослідження, середнє значення для цієї групи зупинилося на 5, однак, два пацієнти, які вижили поступово повернулися до базових значень до 28 дня.

Таблиця 11

Сполуки	Доза, мг/кг	Режим	Початок хвороби (середнє значення $\pm$ середньо-екв. відхил)	Тривалість (дні) (середнє значення $\pm$ середньо-екв. відхил)	Сукупний бальний показник (середнє значення $\pm$ середньо-екв. відхил)
Розчинник	н/і	н/і	9 $\pm$ 0,8	21 $\pm$ 1,3	84 $\pm$ 28,6
39-дезметоксирапаміцин	5	Профілактичний	12 $\pm$ 2,1*	10 $\pm$ 1,8*	17 $\pm$ 4,6*
39-дезметоксирапаміцин	15	Профілактичний	12 $\pm$ 2,4*	10 $\pm$ 3,4*	22 $\pm$ 22*
Циклофосфамід	40	Профілактичний	13 $\pm$ 2,6*	13 $\pm$ 3,4*	33 $\pm$ 14,1*
39-дезметоксирапаміцин	5	Лікувальний	10 $\pm$ 1,0*	15 $\pm$ 1,3*	30 $\pm$ 3,1*
39-дезметоксирапаміцин	15	Лікувальний	9 $\pm$ 1,4	16 $\pm$ 3,3*	32 $\pm$ 5,7*
Циклофосфамід	40	Лікувальний	11 $\pm$ 1,1*	15 $\pm$ 3,2*	37 $\pm$ 26,6*

\* вірогідно відрізняється від пролікованого розчинником контролю,  $p < 0,05$ , ранговий критерій Манна-Уїтні.

Приклад 8 - Дослідження протипухлинної активності 39-дезметоксирапаміцину на моделі гліоми, ортотопічно пересадженої безтимусним мишам

#### 8.1. - Підготовка до дослідження

##### 8.1.1. - Приготування зразків:

Аналізовані сполуки розчиняли в етанолі (0,027 мл/мг сполуки) і струшували протягом 20 хв, поки розчин не ставав прозорим. Етанольні розчини розділяли на придатні аліквоти і зберігали при -20°C. Етанольний розчин потім доводили до потрібної концентрації розчинником (4% етанолу, 5% Tween 20, 5% поліетиленгліколю 400 в 0,15 M NaCl, приготуванням, наскільки це можливо, із стерильних, вільних від ендотоксину компонентів).

##### 8.1.2 - Способи введення

Аналізовану сполуку та контрольний розчин вводили внутрішньовенно (в/в, болюс) шляхом ін'єкції у хвостову вену експериментальних мишей. Використовували об'єм ін'єкції 10 мл/кг, на підставі самої недавньої маси тіла мишей.

##### 8.1.3 - Пухлинна клітинна лінія

Для дослідження використовували клітинну лінію гліобластоми U87-MG, створену J.Ponten із гліобластоми III стадії 44-літньої білої жінки (Ponten et al., 1968).

##### 8.1.4 - Умови клітинної культури для представлення клітинної лінії.

Пухлинні клітини вирощували в моношарі при 37°C у зволоженій атмосфері (5% CO<sub>2</sub>, 95% повітря). Як культуральне середовище використовували RPMI 1640 (Ref. BE12-702F, Cambrex), яке містить 2мМ L-глутаміну, з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Ref. DE14-801E, Cambrex). Клітини прилипали до пластикових фла-

конів. Для експериментального використання пухлинні клітини відокремлювали від культуральних флаконів за допомогою 5-хвилинної обробки трипсин-версеном (Ref. BE17-161E, Cambrex), у розчині Хенкса без кальцію або магнію (Ref. BE10-543F, Cambrex). Клітини підраховували в гемоцитометрі, та оцінювали їхню життєздатність фарбуванням 0,25% трипановим синім.

##### 8.2 - Індукція гліоми стереотаксичною ін'єкцією в мозок безтимусних мишей

Мишам стереотаксично вводили клітини U87-MG на 0 день, через 24 та 48 годин після тотального опромінення організму гамма-випромінюванням (2,5 Гр, Co<sup>60</sup>, INRA BRETENIERE, Діжон). Для стереотаксичного введення пухлинних клітин мишей анестезували інтраперитоніальною ін'єкцією кетаміну, 100 мг/кг (Кетаміл500®, Ref. 043KET204, Centravet, Франція) та ксилазину, 5 мг/кг (Ромпун®, Ref. 002ROM001, Centravet, Франція) в 0,9% розчині NaCl при 10 мл/кг/на ін'єкцію. Клітини стереотаксично вводили з використанням 3 незалежних стереотаксичних апаратів (Kopf Instrument, Німеччина та Stoelting Company, США) у праву лобну долю по ІхІО<sup>5</sup> U87-MG пухлинних клітин, ресуспендованих в 0,002 мл середовища RPMI 1640. 0,002 мл суспензії клітин вводили зі швидкістю 500 нл/хв.

##### 8.3 - Календар лікування

На 7 день мишей зважували та довільно розподіляли за індивідуальною масою тіла на 3 групи. У кожну групу додавали по 4 додаткових мишей для магнітно-резонансної томографії. Групи підбирали таким чином, щоб середня маса тіла в кожній з них статистично не відрізнялася від інших (дисперсій-

ний аналіз). Аналізовані речовини застосовували, як описано нижче.

8.3.1 Миші з 1 групи одержували 5 циклів щоденних в/в ін'єкцій розчинника аналізованих речовин протягом 3 послідовних днів (на 7-9 дні, 14-16 дні, 21-23 дні, 28-30 дні та 35-37 дні: (Q1D × 3) × 5W). Кожний цикл відокремлювали 4-денним періодом виведення.

8.3.2. Миші з 2 групи одержували 5 циклів щоденних в/в ін'єкцій 39-дезметоксирапаміцину по 3 мг/кг/на ін'єкцію протягом 3 послідовних днів (на 7-9 дні, 14-16 дні, 21-23 дні, 28-30 дні та 35-37 дні: (Q1D × 3) × 5W). Кожний цикл відокремлювали 4-денним періодом виведення.

8.3.3. Мишей із групи 3 не лікували.

Узагальнений календар лікування подано у таблиці 12:

Таблиця 12

Групи	Кількість тварин	Лікування	Спосіб введення	Доза (мг/кг/на ін'єкцію)
1	9 (+4)	Розчинник	в/в	-
2	10 (+4)	39-дезметоксирапаміцин	в/в	3
3	16	Не проліковані	н/і	н/і

#### 8.4. - Магнітно-резонансне дослідження

Магнітно-резонансний аналіз мозку виконували на 23 та 37 день. Всі магнітно-резонансні аналізи виконували при 4,7Т на Pharmascan magnet (Bruker, Віссембург). Мишей розташовували у середині призначеної для мишей кошика та циліндричної котушки діаметром 38 мм під безперервною анестезією ізофлюраном. Після тривимірних вимірювань, виконували turboRARE T2 зважену послідовність. Визначення покривали цільний мозок, включаючи пухлину. Об'єм пухлини визначали малюванням вручну, області, яка цікавить (ЦО) навколо пухлини на кожному знімку та підсумовуванням всіх поверхонь.

#### 8.5. - Результати

На Фіг. 7 показана крива виживання кожної пролікованої групи до 43 дня.

Крім того, результати виражені у відсотках (T/C%), де Т представляє середній час виживання тварин, пролікованих 39-дезметоксирапаміцином, а С представляє середній час виживання тварин, пролікованих розчинником. T/C% розраховували, як зазначено далі:

$$T/C\% = [T/C] \times 100$$

Крім того, використовували магнітно-резонансне дослідження для розрахунку середнього підрахованого об'єму пухлини в пролікованій групі, результати узагальнені в таблиці 13 нижче. Так як всі тварини, проліковані розчинником, загинули до 37 дня, неможливо порівняти розміри пухлини на даній стадії.

Таблиця 13

Група	23 день (мм <sup>3</sup> )
Розчинник	18,75
39-дезметоксирапаміцин	1,25

Кожне значення даних представляє середнє з 4 величин.

#### Посилання:

Alvarez, M., Paull, K., Monks, A., Hose, C, Lee, J.S., Weinstein, J., Grever, M., Bates, S., Fojo, T., (1995). "Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen", Journal of Clinical Investigation, 95, 2205-2214.

An, W.L., R.F. Cowburn, et al. (2003). "Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease." Am J Pathol 163(2): 591-607.

Avramut, M. and Achim, C.L (2002). "Immunophilins and their ligands: insights into survival and growth of human neurons." Physiol Behav 77 (4-5): 463-8.

Baker, H., Sidorowicz, A., Sehgal, S.N., and Vezina, C. (1978) "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation". Journal of Antibiotics 31, 539-545.

Boyd, M.R. and Paull, K.D., (1995). "Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen", Drug Development Research 34, 91-109/

Bradl M., Hohlfeld R. (2003), "Molecular pathogenesis of neuroinflammation". J Neurol Neurosurg Psychiatry. 74:1364-70.

Brunn, G.J., Fadden, P., Haystead, T.A., Lawrence, J.C. Jr.(1997) "The mammalian target of rapamycin phosphorylates sites having a (Ser/Thr)-Pro motif and is activated by antibodies to a region near its COOH terminus", J Biol. Chem. 272(51), 32547-32550.

Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C, Wiederrecht, G., Lawrence, J.C, and Abraham, R.T. (1996) "Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002". EMBO Journal 15:5256-5267.

Chang, S.M., P. Wen, et al. (2005). "Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme." Invest New Drugs 23(4): 357-61.

Crowe, A., Bruelisauer, A., Duerr, L, Guntz, P., Lemaire, M., (1999), "Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats". Drug Metab Dispos.; 27(5), 627-32.

Cummins, C.L, Jacobsen, W., Christians, U., Benet, L.Z., (2004), CYP3A4-Transfected Caco-2 Cells as a Tool for Understanding Biochemical Absorption Barriers: Studies with Sirolimus and Midazolam", The Journal of Pharmacology, 308(1), 143-155.

Dancey, J.E., (2002), "Clinical development of mammalian target of rapamycin inhibitors" *Hematol Oncol Clin N Am*, 16,1101-1114.

Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelsmann R. and Fiebig HH. (1995) "Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay". *Anti-Cancer Drugs*, 6, 522-532.

Dumont, F.J. and Su, Q.X. (1995). "Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin". *Life Sciences* 58(5): 373-395.

Emborg M.E., (2004) "Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies" *J Neurosci Methods*, 139 (2):121-43.

Fiebig H.H., Dengler W.A. and Roth T. (1999) "Human tumor xenografts: Predictivity, characterization, and discovery of new anticancer agents". In: Fiebig HH, Burger AM (eds). *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*. *Contrib. Oncol.*, 54:29 - 50.

Findlay J.A. and Radics, L (1980) *Canadian Journal of Chemistry* 58:579.

Gallant-Haidner H.L., Trepanier D.J., Freitag D.G., Yatscoff R.W. 2000, "Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus". *Ther Drug Monit.* 22(1), 31-5.

German D.C. and Eisch A.J., (2004), "Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment". *Rev Neurosci*, 15:353-69.

Grass, G.M., Rubas, W., Jezyk, N., (1992) "Evaluation of CACO-2 monolayers as a predictor of drug permeability in colonic tissues". *FASEB Journal*, 6, A1002.

Gregory MA, Gaisser S, Lill R.E., Hong H, Sheridan R.M., Wilkinson B, Petkovic H, Weston A.J., Carletti I, Lee H.L, Staunton J, Leadlay PF. (2004) "Isolation and characterization of pre-rapamycin, the first macrocyclic intermediate in the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin by *S. hygroscopicus*". *Angew Chem. Int Ed Engl.* 43(19), 2551-3.

Hersch S.M. and Ferrante R.J., (2004), Translating therapies for Huntington's disease from genetic animal models to clinical trials", *NeuroRx*. 1(3):29B-306.

Huang, S. and Houghton, P.J., 2002. "Mechanisms of resistance to rapamycins". *Drug Resist. Update*, 4(6), 37B-391.

Huang, S., Bjornsti, M. A. and Houghton P.J. (2003). "Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance." *Cancer Biol Ther* 2(3): 222-32.

Kahan, B.D., Chang, J.Y., and Sehgal, S.N. (1991) Treclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin". *Transplantation* 52:185-191.

Kirchner, G.I., Winkler, M, Mueller L, Vidal, C, Jacobsen, W., Franzke, A., Wagner, S., Blick, S., Manns M.P., and Sewing K.-F.(2000) Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD". *British Journal of Clinical Pharmacology* 50:449-454.

Kuhn B., Jacobsen W., Christians U., Benet L.Z., Kollman P.A. (2001), "Metabolism of sirolimus and its derivative everolimus by cytochrome P450 3A4:

insights from docking, molecular dynamics, and quantum chemical calculations". *J Med Chem.* 44(12), 2027-34.

Kuo, C.J., Chung, J.K., Florentine, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J., and Crabtree, G.R. (1992) "Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase". *Nature* 358: 70-73.

Lampen A., Zhang Y., Hackbarth I., Benet L.Z., Sewing K.F., Christians U. (1998) "Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine". *Pharmacol Exp Ther.* 285(3), 1104-12.

Langmann T., Mauerer R., Zahn A., Moehle C, Probst M., Stremmel W., Schmitz G. (2003) "Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues". *Clin Chem.* 49(2), 230-8.

Laplante A., Demeule M., Murphy G.F., Beliveau R. (2002) "Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial P-gp". *Transplant Proc.* 34(8), 3393-5.

Lee, J.-S., Paull, K., Alvarez, M., Hose, C, Monks, A., Grever, M., Fojo, A.T., Bates, S.E., 1994. "Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute drug screen". *Molecular Pharmacology* 46,627-638.

Lee J.K., Bussey K.J., Gwady F.G., Reinhold W., Riddick G., Pelletier S.L., Nishizuka S., Szakacs G., Annereau J.P., Shankavaram U., Lababidi S., Smith L.H., Gottesman M.M., Weinstein J.N. (2003) "Comparing cDNA and oligonucleotide array data: concordance of gene expression across platforms for the NCI-60 cancer cells". *Genome Biol.* 4(12), R82.

Li, A. P. (1992) "Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery". *Drug Discovery Today*, 6, 357-366.

Lowden, P.A.S., (1997) Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Studies on the biosynthesis of rapamycin".

Main, E.R.G., Fulton, K.F. & Jackson, S.E. (1998). "The Context-Dependent Nature of Destabilising Mutations on the Stability of FKBP12". *Biochemistry* 37, 6145-6153.

Main, E.R.G., Fulton, K.F. & Jackson, S.E. (1999). "Folding of FKBP12: Pathway of Folding and Characterisation of the Transition State". *J. Mol. Biol.* 291, 429-444.

McAlpine, J.B., Swanson S.J., Jackson, M., Whittern, D.N. (1991). "Revised NMR assignments for rapamycin". *Journal of Antibiotics* 44:688-690.

Meiering, E.M., Serrano, L. & Fersht, A.R. (1992). "Effect of Active Site Residues in Barnase on Activity and Stability". *J. Mol. Biol.* 225, 585-589.

Mothe-Satney, I., Brunn, G.J., McMahon, L.P., Capaldo, C.T., Abraham, R.T., Lawrence, J.C. Jr. (2000) "Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies". *J Biol Chem.* 275(43), 33836-33843.

Paiva, N.L., Demain, A.L. and Roberts, M.F. (1991) "Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin By *Streptomyces hygroscopicus*". *Journal of Natural Products* 54: 167-177.



Pardridge, (2005), "The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development", *NeuroRx*, 2, 3-14.

Perin, E.C., (2005), "Choosing a Drug-Eluting Stent: A Comparison Between CYPHER and TAXUS", *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 6 (suppl 1), ppS13-S21.

Persidis A. (1999), "Cancer multidrug resistance" *Nat Biotechnol.* 17: 94-5.

Poten J. et al., (1968), "Long term culture of normal and neoplastic human glia". *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 74: 465-86.

RaughtB., Gingras, A-C. and Sonenberg, N.; (2001), "The target of rapamycin (TOR) proteins", *PAW5*, 98(13): 7037-7044.

Ravikumar, B., R. Duden, et al. (2002). "Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy," *Hun; Mol Genet* 11(9): 1107-17.

Reather, J. A., (2000), Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Late steps in the biosynthesis of macrocyclic lactones".

Roth T., Burger A.M., Dengler W., Wilimann H. and Fiebig H.H. (1999) "Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening". In: Fiebig HH, Burger AM (eds). *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*. *Contrib. Oncol.*, 54:145-156.

Sathasivam, K., C Hobbs, et al. (1999). "Transgenic models of Huntington's disease." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1386): 963-9.

Sedrani, R., Cottens, S., Kallen, J., and Schuler, W. (1998) "Chemical modifications of rapamycin: the discovery of SDZ RAD". *Transplantation Proceedings* 30: 2192-2194.

Sehgal, S.N., Baker, H., and Vezina, C (1975) "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization". *The Journal of Antibiotics* 28: 727-733.

Schober A. (2004), "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP" *Cell Tissue ftes*, 318(1): 215-24).

Stein U., Jurchott K., Schlafke M., Hohenberger P. (2002) "Expression of multidrug resistance genes MVP, MDR1, and MRP1 determined sequentially before, during, and after hyperthermic isolated limb perfusion of soft tissue sarcoma and melanoma patients". *J Clin Oncol.* 20 (15) :3282-92.

Szakacs G., Annereau J.P., Lababidi S., Shankavaram U., Arciello A., Bussey K.J., Reinhold W., Guo Y., Kruh G.D., Reimers M., Weinstein J.N., Gottesman MM. 2004, "Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells". *Cancer Cell.* 6(2):129-37.

Tanford, C (1968). "Protein Denaturation". *Adv. Prot Chem.* 23, 121-282.

Tanford, C. (1970). "Protein Denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation". *Advances in Protein Chemistry* 24, 1-95.

Tee, A.R. and Proud, C.G. (2002) "Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of Cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1674-1683.

Trepanier D.J., Gallant H., Legatt D.F., Yatscoff R.W. (1998), "Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update". *Clin Biochem.* 31(5):345-51.

Vezina, C, Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975) "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle". *The Journal of Antibiotics* 28: 721-726.

Volpe, D.A., Faustino, P.J., Yu, L.X., (2001) Towards standardisation of an in vitro method of drug absorption". *Pharmacopeia! Forum*, 27, 2916-2922.

Yu, K., Toral-Barza, L, Discafani, C, Zhang, W.G., Skotnicki, J., Frost, P., Gibbons, J.J. (2001) "mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer". *Endocrine-Related Cancer* 8: 249-258.

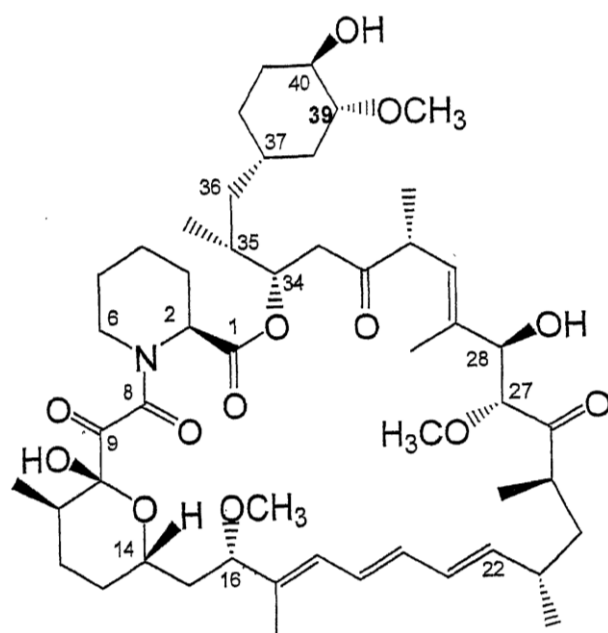


Fig. 1

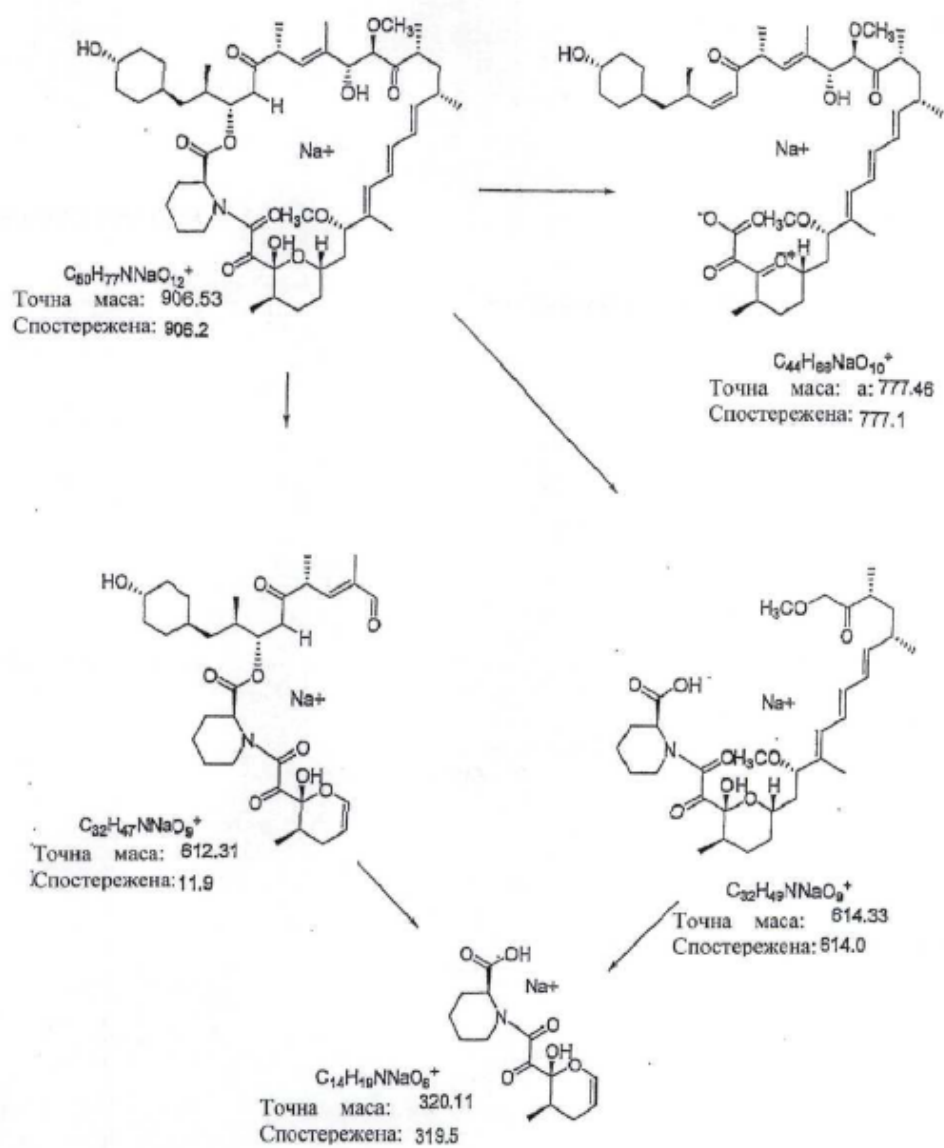
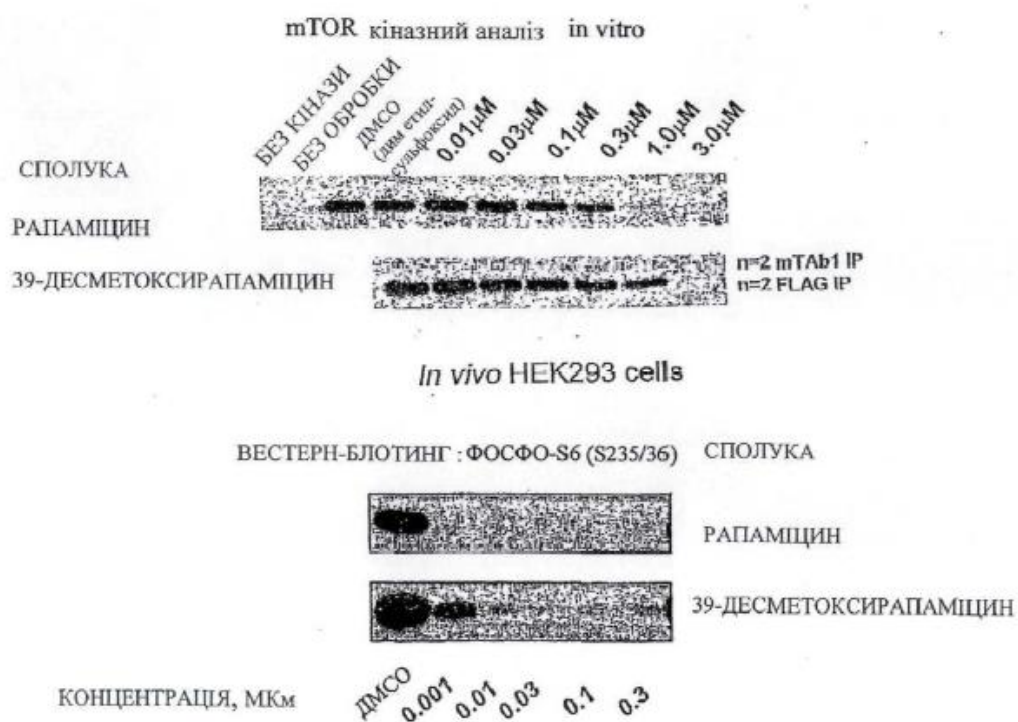
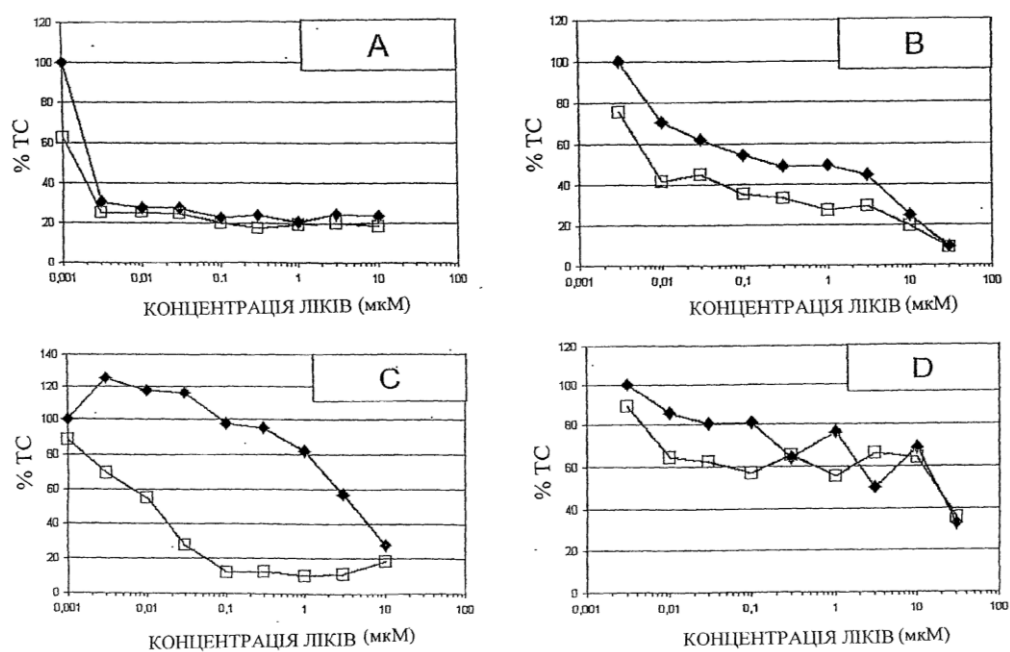


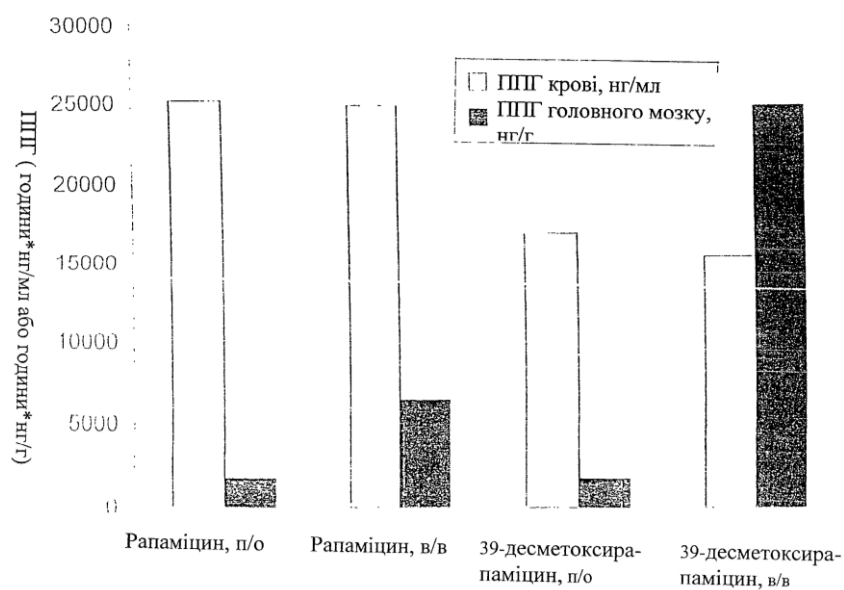
Fig. 2



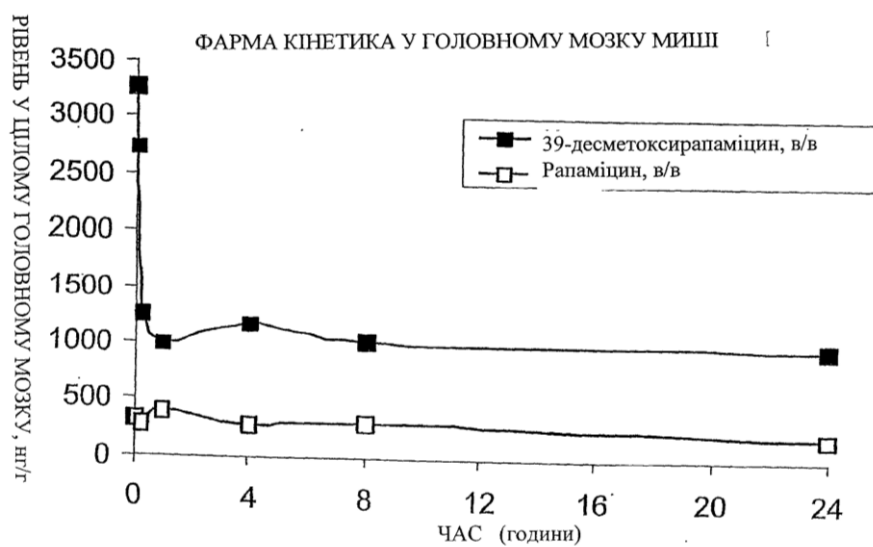
Фіг. 3



Фіг. 4

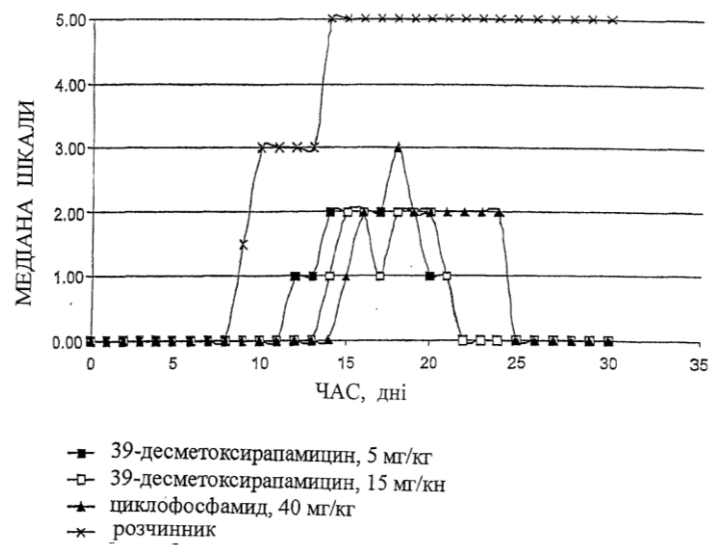


Фіг. 5 А

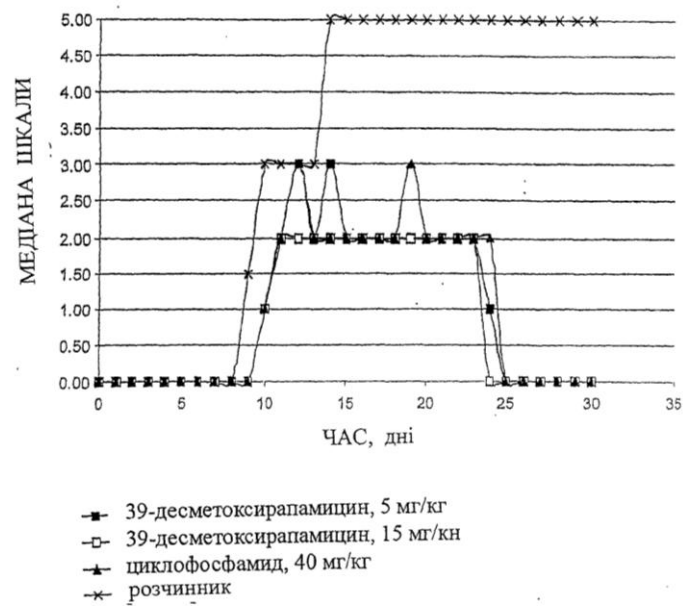


Фіг. 5 В

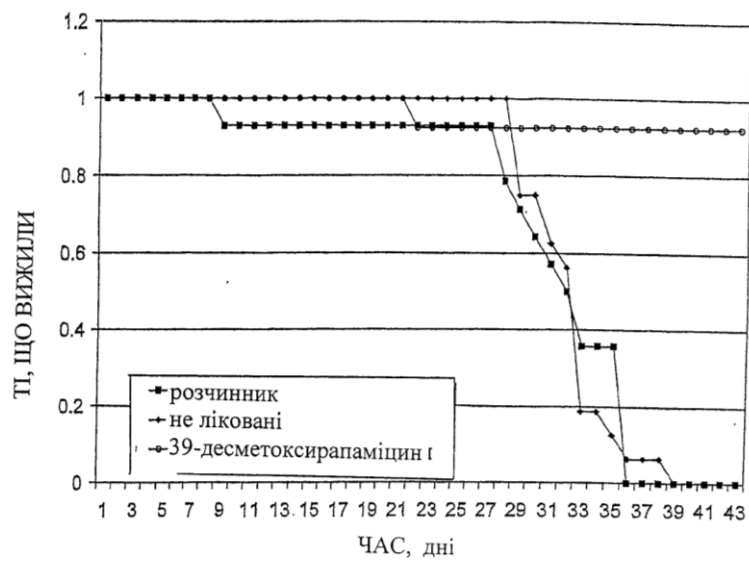
A



Фіг. 6 А



Фіг. 6 В



Фіг. 7