



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45974 (13) C2

(51) 6 A61K31/415

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ТЕРПЕНОЇДНІ ПОХІДНІ (САРКОДИКТИЇНИ), ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ ЯК ПРОТИПУХЛИННІ ЗАСОБИ

1

(21) 97020639
(22) 23 04 1996
(24) 15 05 2002
(86) PCT/EP96/01688, 23 04 1996
(31) 9509888 5
(32) 16 05 1995
(33) GB
(46) 15 05 2002, Бюл. № 5, 2002 р.
(72) Баттістіні Карло, ІТ, Чьомеї Марина, ІТ, Пьетра Франческо, ІТ, Д'амброзіо Мікеле, ІТ, Гуеррьєро Антоніо, ІТ
(73) ФАРМАЦІЯ ЕНД АПДЖОН С П А, ІТ
(56) *Helv Chim Acta* (1988), vol 71, 964-976
Helv Chim Acta (1987), vol 70, 2019-2027
(57) 1 Соединение, выбранное из группы, состоящей из
(-)-(4R,4aR,7R,10S,11S,12aR,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-7-гидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил-(E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилата (саркодиктин А),
(-)-(4R,4aR,7R,10S,11S,12aR,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-6-(этокси-карбонил)-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-7-гидрокси-1,10-ди-метил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил-(E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилата (саркодиктин В),
(-)-(3R,4S,4aS,7S,10R,11R,12aS,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-3,7-дигидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил-(E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилата (саркодиктин С),
(-)-(3R,4S,4aS,7S,10R,11R,12aS,1Z,5E,8Z)-3-ацетокси-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12,12a-

2

октагидро-7-гидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил-(E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилата (саркодиктин D),
(+)-(3R,4S,4aS,7S,10R,11R,12aS,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-3,7-дигидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил-(Z)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилата (саркодиктин E), и
(+)-(1R,4R,4aR,7R,10S,11S,12aR,2Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-1,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-1,7-дигидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил-(E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилата (саркодиктин F),
для использования в качестве терапевтического агента
2 Соединение по п. 1 для получения медикамента для применения в качестве терапевтического антинеопластического агента при лечении злокачественных опухолей человека или животных
3 Фармацевтическая композиция, которая включает в качестве активного ингредиента соединение по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель
4 Фармацевтическая композиция по п. 3 для использования в качестве активатора сборки трубулина, вызывающего приостановку деления опухолевых клеток
5 Фармацевтическая композиция по п. 3 для использования в качестве терапевтического антинеопластического агента при лечении злокачественных опухолей человека или животных

Настоящее изобретение относится к терпеноидным производным, известным как саркодиктины (*Sarcodictyins*) (*Helvetica Chimica Acta*, том 70, 1987, 2019-2027 и *Helvetica Chimica Acta*, том 71, 1988, 964-976), которые могут быть полезными в качестве терапевтических агентов

О возможном терапевтическом применении саркодиктинов, упомянутых в настоящей заявке, ранее не сообщалось

В частности, согласно настоящему изобретению, саркодиктины ввиду их цитотоксической активности могут использоваться в качестве терапевтических антинеопластических агентов при лечении злокачественных опухолей человека или животных

Соответственно, настоящее изобретение относится к соединению, выбранному из следующей группы

(13) C2

(11) 45974

(19) UA

(-)-(4R,4aR,7R,10S,11S,12aR,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-7-гидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил (E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилат (саркодиктин A),

(-)-(4R,4aR,7R,10S,11S,12aR,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-6-(этоксикарбонил)-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-7-гидрокси-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил (E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилат (саркодиктин B),

(-)-(3R,4S,4aS,7S,10R,11R,12aS,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-3,7-дигидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил (E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилат (саркодиктин C),

(-)-(3R,4S,4aS,7S,10R,11R,12aS,1Z,5E,8Z)-3-ацетокси-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12a-октагидро-7-гидрокси-6-метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил (E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилат (саркодиктин D),

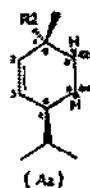
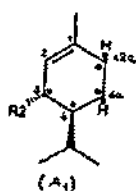
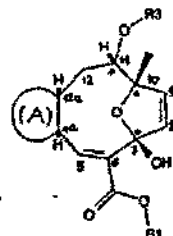
(+)-(3R,4S,4aS,7S,10R,11R,12aS,1Z,5E,8Z)-7,10-эпокси-3,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-3,7-дигидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил (Z)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилат (саркодиктин E), и

(+)-(1R,4R,4aR,7R,10S,11S,12aR,2Z,5E,8Z)-

7,10-эпокси-1,4,4a,7,10,11,12,12a-октагидро-1,7-дигидрокси-6-(метоксикарбонил)-1,10-диметил-4-(1-метилэтил)бензоциклодецен-11-ил (E)-3-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)акрилат (саркодиктин F),

для использования в качестве терапевтического агента

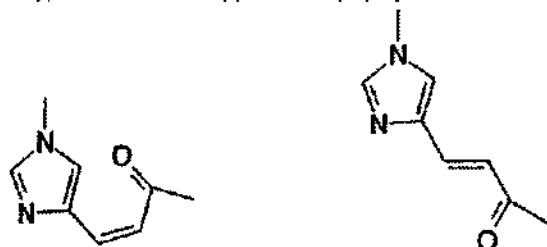
Структурные формулы вышеперечисленных соединений представлены в таблице 1, ниже, со ссылкой на следующие формулы



В приведенных выше формулах символ* представляет хиральный центр

Таблица 1				
Соединение	(A)	R ₁	R ₂	R ₃
саркодиктин A	(A ₁)	Me	H	(E)u
саркодиктин B	(A ₁)	Et	H	(E)u
саркодиктин C	(A ₁)	Me	OH	(E)u
саркодиктин D	(A ₁)	Me	OAc	(E)u
саркодиктин E	(A ₁)	Me	OH	(Z)u
саркодиктин F	(A ₂)	Me	OH	(E)u

В таблице 1 символ Me означает метил, символ Et означает этил, символ oAc означает OCOCH₃, символы (E)u и (Z)u представляют, соответственно, (E) и (Z) уроканойльный фрагмент формулы



В частности, вышеперечисленные саркодиктины A-F могут быть полезны в качестве терапевтических агентов при лечении злокачественных опухолей человека и животных, благодаря их цитотоксической противоопухолевой активности. Злокачественная опухоль может представлять собой саркомы, карциномы, лимфомы, нейробластомы, меланомы, миеломы, опухоль Вильмса, лейкемии и аденокарциномы.

Саркодиктины настоящего изобретения могут получаться выделением из средиземноморского образующего столон коралла "Sarcodictyon Roseum" (Rolandia rosea) (Forbes 1847), согласно методике, описанной в Helvetica Chimica Acta, том 70, 1987, стр 2025

Биологическая активность саркодиктинов настоящего изобретения была продемонстрирована с помощью (a) испытания in vitro по оценке их активности в отношении стимулирования сборки тубулина и (b) испытания in vitro по оценке их цитотоксической активности в отношении как клеток L 1210, так и клеток L 1210, резистентных к доксорубину (L 1210/Dx)

В качестве примера, активность саркодиктина A (внутренний код FCE 29123) и саркодиктина C (внутренний код FCE 29119) оценивали согласно методикам, описанным в испытаниях (a) и (b)

(a) испытание по сборке тубулина

Тубулин из мозга теленка приготавливали посредством двух циклов сборки-деструктурирования (Shelanski M L, Gaskin F and Cantor C R, Proc Natl Acad Sci USA 70, 765-768, 1973) и хранили в жидком азоте в MAB (0.1 M MES, 2.5% mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, pH

6 4)

Все эксперименты выполнялись на белке, который хранился менее 4 недель

Перед каждым экспериментом тубулин хранился в течение 30 минут при 4°C. Сборку оценивали по методу Gaskin et al (Gaskin F, Cantor C R and Shelanski M L, J Molec Biol 89, 737-758, 1974)

Кювету (длина оптического пути 1см), содержащую тубулин (1мг/мл) и 1мМ GTP, нагревали до 37°C и производили непрерывные измерения мутности при 340нм на двухлучевом двухволновом спектрофотометре Perkin-Elmer 557, снабженном

автоматическим регистратором и термостатически регулируемой камерой для образцов

Спустя 30 минут добавляли 4мМ CaCl₂ и измеряли деполимеризацию в течение 10 минут по уменьшению мутности

С регулярными интервалами в 15 минут добавляли масштабные дозы испытуемых соединений и оценивали изменения мутности

Данные выражали в виде процента реполимеризации, вызванной испытуемыми соединениями. Полученные результаты представлены в таблице 2

Таблица 2

Соединение	дозировка (мкМ)	сборка тубулина (%)
саркодиктиин А (FCE 29123)	4	70
	40	162
саркодиктиин С (FCE 29119)	3.9	112
	39	173

Вышеприведенные табличные данные ясно показывают, что испытуемые саркодиктиины способны стимулировать реполимеризацию тубулина даже в присутствии CaCl₂, который обычно ингибирует сборку тубулина

Хорошо известно, что микротрубочки являются одними из наиболее стратегически важных субклеточных мишеней противоопухолевых химиопрепаратов (Rowinsky et al, Review, том 82, № 15, 1 августа 1990)

В отличие от классических агентов, действующих против микротрубочек, таких как колхицин и винка алкалоиды, которые вызывают деполимеризацию микротрубочек, саркодиктиины, как представляется, обладают механизмом действия, сходным с таковым таксола, одного из наиболее интересных противораковых агентов, появившихся в результате скрининга природных продуктов, который заключается в индуцировании полимеризации тубулина и образовании чрезвычайно стабильных, не способных функционировать микротрубочек

Таким образом, саркодиктиины могут использоваться как терапевтические антинеопластические агенты при лечении злокачественных опухолей человека и животных, ввиду их способности катализировать быстрое образование и стабилизацию микротрубочек, что приводит к приостановке деления опухолевых клеток

(b) культуры клеток и анализ чувствительности к лекарству

Клеточные линии мышинной лейкемии L1210 и L1210/DX (устойчивые к доксорубину) выращивали in vitro в виде стационарной культуральной суспензии в среде RPMI 1640 (GIBCO, Grand island, NY), с добавлением 10% сыворотки плода коровы (Flow, Irvine, UK), 2мМ L-глутамина (Gibco, Europe, Glasgow, UK), 10мкМ β-меркаптоэтанол, 100 ЕД/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина

Экспоненциально растущие клетки высевали (1 x 10⁵ клеток/мл) на 12-луночные планшеты (Costar, Cambridge, MA) и сразу же после высевания добавляли испытуемые соединения в различных концентрациях

Планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO₂

Ингибирование клеточного роста оценивали путем подсчета выживших клеток на счетчике ZBI Coulter (Hialeah, FL). 50% ингибирующую концентрацию (IC₅₀) рассчитывали по полученной кривой зависимости концентрация-ответ. Для каждой концентрации испытуемого соединения использовали дубликатные культуры

Полученные результаты представлены в таблице 3

Таблица 3

Соединение	IC ₅₀ ,	(нМ)*	И Р
	L1210	L1210/DX	
саркодиктиин А (FCE 29123)	539.2 ± 97.7	754.5 ± 80.3	1.4
саркодиктиин С (FCE 29119)	408.5 ± 21.3	578.7 ± 182.6	14.2

*обработка в течение 48 часов

$$\text{И Р} = \text{индекс резистентности} = \frac{\text{IC}_{50}\text{L1210/DX}}{\text{IC}_{50}\text{L1210}}$$

Как видно из приведенных в таблице данных, саркодиктиины демонстрировали хорошую цитотоксическую активность in vitro в отношении клеток L1210, а также в отношении клеток L1210, ус-

тойчивых к доксорубину (L1210/DX)

В силу их эффективности в отношении клеток L1210/DX саркодиктиины могут быть полезны при лечении опухолей, резистентных к химиотерапев-

тическим агентам, таким как, например, антрацилиновые гликозиды, в частности, доксорубин

Человека или животное можно лечить способом, который включает введение ему фармацевтически эффективного количества соединения, выбранного из саркодиктиина А, саркодиктиина В, саркодиктиина С, саркодиктиина D, саркодиктиина Е и саркодиктиина F. Посредством этого состояние человека или животного может улучшаться.

Саркодиктиины изобретения можно назначать для приема в виде множества лекарственных форм, например, перорально в форме таблеток, капсул, таблеток, покрытых сахаром или пленкой, жидких растворов или суспензий? ректально в форме суппозитория, парентерально, например, внутримышечно, или путем внутривенных инъекций или инфузий.

Доза зависит от возраста, веса, состояния пациента и способа введения, например, доза, предназначенная для перорального приема взрослыми, например, для типичного соединения настоящего изобретения, FCE 29213 (саркодиктиина А), может варьировать приблизительно от 0.01 г до 1 г в день.

Настоящее изобретение включает также фармацевтические композиции, содержащие саркодиктин настоящего изобретения в качестве активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым эксципиентом (которым может быть носитель или разбавитель).

Фармацевтические композиции, содержащие соединения настоящего изобретения, обычно готовят стандартными способами и назначают для приема в фармацевтически подходящей форме.

Например, твердые формы для перорального приема могут содержать, помимо активного соединения, разбавители, например, лактозу, декстрозу, сахарозу, целлюлозу, кукурузный или картофельный крахмал, смазывающие агенты, например, диоксид кремния, тальк, стеариновую кислоту, стеарат магния или кальция и/или полиэтиленгликоли, связующие агенты, например, крахмалы, аравийскую камедь, желатин, метилцеллю-

лозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливинилпирролидон, дезагрегирующие агенты, например, крахмал, альгиновую кислоту, альгинаты или гликолят натрия-крахмала, шипучие смеси, красители, подсластители, увлажняющие агенты, такие как лецитин, полисорбаты, лаурилсульфаты и обычные нетоксичные и фармакологически неактивные вещества, которые используются в фармацевтических рецептурах.

Указанные фармацевтические препараты могут производиться известными способами, например, посредством процессов смешения, гранулирования, таблетирования, нанесения пленки или покрытия из сахара.

Жидкие дисперсии для перорального приема могут представлять собой, например, сиропы, эмульсии и суспензии.

Сиропы могут содержать в качестве носителя, например, сахарозу или сахарозу с глицерином и/или маннит и/или сорбит.

Суспензии и эмульсии могут содержать в качестве носителя, например, природную смолу, агар, альгинат натрия, пектин, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливиниловый спирт.

Суспензия или раствор для внутримышечных инъекций может содержать, например, вместе с активным соединением, фармацевтически приемлемый носитель, например, стерильную воду, оливковое масло, этилолеат, гликоли, например, пропиленгликоль, и, если это желательно, подходящее количество гидрохлорида лидокаина.

Растворы для внутривенных инъекций или инфузий могут содержать в качестве носителя, например, стерильную воду, или, предпочтительно, могут находиться в виде стерильных водных изотонических солевых растворов.

Суппозитории могут содержать вместе с активным соединением фармацевтически приемлемый носитель, например, масло какао, полиэтиленгликоль, сложный эфир полиоксиэтиленсорбита в качестве поверхностно-активного вещества или лецитин.