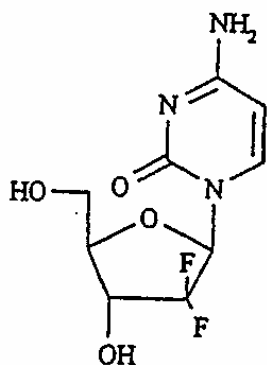


Цей винахід стосується до визначених 2',2'-дифтор-дезокситидинових (гемцитабінових) похідних насичених і мононенасичених жирних кислот із довгим ланцюгом і фармацевтичними композиціями, які містять їх. Гемцитабін має формулу:

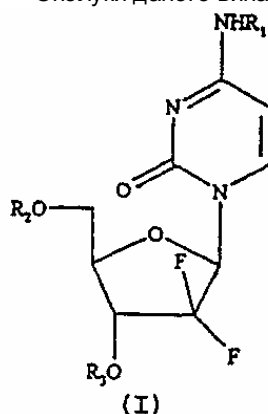


Гемцитабін представляє собою нуклеозидний аналог, який у дослідженнях *in vitro* і *in vivo* показав активність при лікуванні неопластичних станів. (New anticancer agents, Weiss et al, Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers Annual 16, editors Pinedo, Longo and Chabner, 1996. Elsevier Science B.V., Supplement to Seminars in Oncology, Vol.22, № 4, Suppl.11, 1995, editors Yarbrow et al. Gemcitabine Hydrochloride: Status of Preclinical Studies). При клінічних випробуваннях гемцитабіну також спостерігається вигідний ефект. У цих дослідженнях як клінічні, так і побічні впливи гемцитабіну є високо залежними.

Гемцитабін активується всередині клітини дезоксицитидинкіназою до його активної форми: - трифосфату гемцитабіну (dFdCTP). Паралельно з цим дезоксицитидиндезаміназа інактивує гемцитабін до відповідної похідної урацилу (неактивного).

Заявники знезацька виявили, що визначені похідні жирних кислот гемцитабіну характеризуються цілком зміненою фармакокінетикою і розподілом у тканинах. Це відбувається особливо у випадку злоякісних захворювань RES (ретікулоендотеліальної системи), легень, підшлункової залози, кишечника, стравоходу, матки, яєчників, молочної залози і при меланомі.

Сполуки даного винаходу представлені формулою 1:



де R_1 , R_2 і R_3 , незалежно вибирають із водню і C_{18} і C_{20} насичених і мононенасичених ацильних груп, за умови, що R_1 , R_2 і R_3 - усі не можуть бути воднем.

Гемцитабін має три функціональні групи, а саме 5'- і 3'- гідроксильні групи і N^4 -аміно групу. Кожну групу вибірково перетворюють в ефірну або амідну похідну, однак також утворюються ди-аддукти (ди-ефіри й ефір-аміди) і три-аддукти. У випадку ди- і три-аддуктів немає необхідності, щоб ацильні заміщували були однаковими.

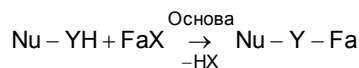
У даний момент переважні моноацильні похідні даного винаходу, тобто із двома з R_1 , R_2 і R_3 , які є воднем. Особливо переважно, що монозаміщення ацильною групою відбувається в 3'-О і 5'-О положеннях цукрового фрагмента, найбільш переважно 5'-О заміщення.

Подвійний зв'язок мононенасичених ацильних груп може знаходитися в цис або транс конфігурації, хоча терапевтичний ефект може відрізнятися в залежності від використовуваної конфігурації.

Положення подвійного зв'язку в мононенасичених ацильних групах також впливає на активність. У даному випадку переважно використовувати ефіри або аміди, які мають ненасичені зв'язки в $\omega-9$ положенні. У *w*-системі номенклатури, *w* положення подвійного зв'язку мононенасиченої жирної кислоти рахують від кінцевої метальної групи так, що, наприклад, ейкозенова кислота ($C_{20}:1 \omega-9$) містить 20 атомів вуглецю у ланцюгу й утворює єдиний подвійний зв'язок між 9 і 10 вуглець, рахуючи від метального кінця ланцюга. У винаході віддають перевагу використовувати ефіри, ефір-аміди й аміди, похідні олеїнової кислоти ($C_{18}:1 \omega-9$, цис), елаїдинової кислоти ($C_{18}:1 \omega-9$, транс), ейкозенової кислоти (т) ($C_{20}:1 \omega-9$, цис) і ($C_{20}:1 \omega-9$, транс), а найбільш переважними похідними даного винаходу є аміди і 5'-ефіри.

У деяких випадках із користю використовують ефіри, ефір-аміди й аміди гемцитабіну, похідні стеаринової кислоти ($C_{18}:0$) і ейкозенової кислоти ($C_{20}:0$).

Відповідно до даного винаходу похідні гемцитабіну звичайно одержують за наступним рівнянням реакції:



де Nu-YH означає гемцитабін, Y представляє собою кисень у 3' або 5' положенні цукрового фрагмента, або азот у 4 положенні піримідинового фрагмента гемцитабіну; Fa представляє собою ацильну групу моновенасиченої C₁₈ або C₂₀ жирної кислоти, і X представляє собою групу, яка видаляється, наприклад, Cl, Br, 3-тіазолідин-2-тіон або OR¹, де R¹ представляє собою Fa, COCH₃, COEt або COCF₃. Таким чином, реакція відбувається за допомогою ацилювання нуклеозиду. Це супроводжується використанням прийнятних реактивних похідних жирних кислот, галоїдангідридів або ангідридів кислоти.

Звичайно необхідна присутність акцептора протонів для поглинання кислого HX, який виділяється реакцією. Тому може бути добавлена основа в реакційну суміш.

Наприклад, якщо використовують голоїдангідрид такий, як хлорангідрид, до реакційної суміші добавляють основу третинного аміну таку як триетиламін, N,N-диметиламілін, піридин або N,N-диметиламін піридин для зв'язування галоїдводневої кислоти, яка виділяється. В інших випадках, застосовуваний у реакції розчинник служить у якості акцептора протонів.

Як правило, реакція ацилювання протікає без каталізатора. У деяких випадках реактивне Похідна жирної кислоти Fa може бути одержана *in situ* у результаті сполучення реагентів таких як N,N-дициклогексилкарбодіімід (ДСС), N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл) карбодіімід (ЕДС) або 0-(1H-бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуроній тетрафторборат (TBTU).

Переважно реакції проводять у нереактивному розчиннику, такому як N,N-диметилформамід, або галоїдованому вуглеводні, такому, як дихлорметан. При необхідності, будь-яку з вищезгаданих основ третинного аміну використовують у якості розчинника, слідкуючи за присутністю відповідного надлишку. У цьому випадку окремий акцептор протонів не потрібний. Переважно реакцію підтримують при температурі між 5°C і 25°C. Після періоду від 1 години до 60 годин реакція, власне кажучи, завершується. Результат реакції аналізують тонкошаровою хроматографією (TLC=ТСХ) і відповідної системи розчинників. Після завершення реакції, що встановлюють за допомогою ТСХ, продукт екстрагують органічним розчинником і очищують хроматографією і/або перекристалізацією з відповідної системи розчинників. Так як у гемцитабіні присутні більше однієї гідроксильної групи й аміногрупа може бути отримана сумішшю ацильованих сполук. При необхідності, індивідуальні моно- і мультиацильовані похідні можуть бути розділені за допомогою, наприклад, хроматографії, кристалізації і вкрай необхідної екстракції, і так далі.

Коли необхідно одержати мультиацильну сполуку формули 1, у якій R₁ і/або R₂ і/або R₃ представляють собою ту ж саму ацильну групу, то переважно застосовують вищезгаданий спосіб(способи), використовуючи відповідний ацил-реагент(ацил-реагенти) у надлишку.

Для одержання мультиацильних сполук формули 1, у яких R₁ і/або R₂ і/або R₃ розрізняються, переважно застосовують вищенаведені способи східчасто при відповідному відборі реагенту. Також для проведення специфічної реакції використовують належним чином обрані захищаючі групи. Вибір цих способів поданий на схемі 1 нижче. Використовують будь-яке сполучення способів для одержання специфічного продукту.

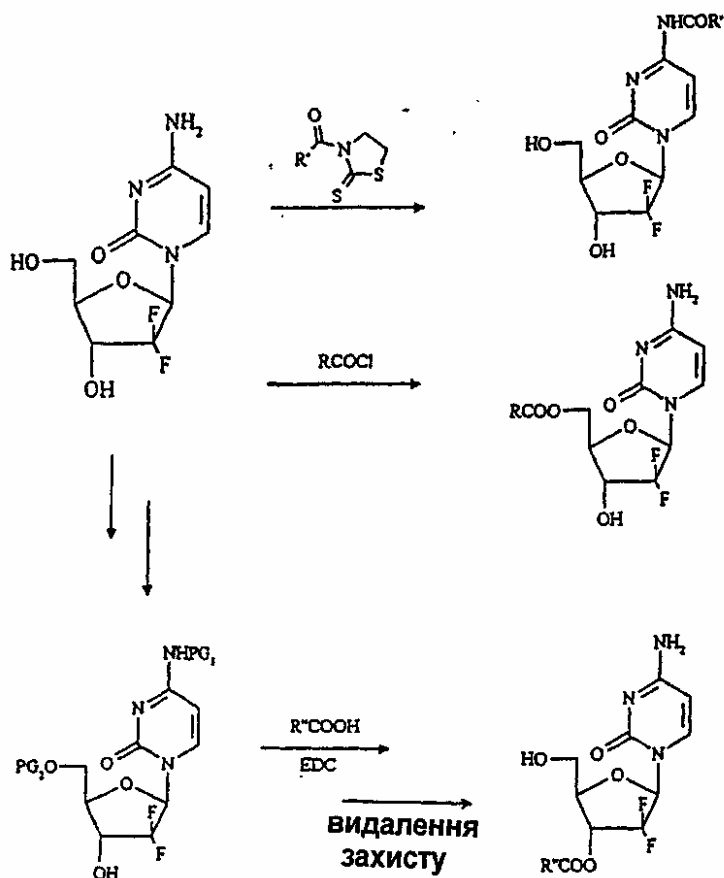


Схема 1.

Наступні приклади ілюструють одержання двох переважних похідних гемцитабіну цього винаходу.

У прикладах використовують такі скорочення:

DMF - диметилформамід (ДМФ)

NMR-ЯМР

d - дублет

br - широкий

S- синглет

t - триплет

m - мультиплет

Приклад 1

Ефір елаїдинової кислоти (5')-гемцитабіну

До розчину 2', 2'-дифтордезоксирибозифуранозилцитозину (гемцитабіну) (0,42г, 1,6ммоль) у 30 мл ДМФ добавляють 0,81мл ДМФ, який містить 1,6ммоль HCl (г) із наступним додаванням розчину хлорангідриду елаїдинової кислоти (0,51г, 1,7ммоль) у 3 мл ДМФ і реакційну суміш перемішують при температурі навколишнього середовища протягом 12 годин. Розчинник випарюють під високим вакуумом, а неочищений (сирий) продукт очищають на колонці із силікагелем 15% метанолом у хлороформі в якості елююючої системи. Неочищені фракції повторно очищають, щоб одержати в підсумку 0,25 г (30%) названої сполуки.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 300 МГц) δ: 7,5 (1H, д, ArH), 7,45 (2H, шир.с, NH₂), 6,45 (1H, д, -OH), 6,17 (1H, т, CH-1'), 5,8 (1H, д, Ar), 5,35 (2H, м, CH=CH), 4,4-4,05 (3H, м, CH₂-5' і CH-4'), 3,95 (1H, м, CH-3'), 2,35 (2H, т, CH₂-COO), 1,95 (4H, м, CH₂-CH=), 1,55 (2H, м, CH₂-C-COO), 1,25 (20H, м, CH₂), 0,85 (3H, т, CH₃).

¹³C ЯМР (DMSO-d₆, 75 МГц) δ: 172,67 (COO), 165,63 (C-4), 154,51 (C-2), 141,12 (C-6), 130,08 і 130,03 (C-9"/C-10"), 126,09, 122,67 і 119,24 (т, C-2'), 94,86 (C-5), 83,90 (C-1'), 77,36 (C-4'), 70,41, 70,11 і 69,80 (т, C-3'), 62,53 (C-5'), 33,24, 31,95, 31,29, 29,00, 28,94, 28,84, 28,72, 28,50, 28,43, 28,33, 24,34, 22,11 (CH₂), 13,94 (CH₃).

Крім того, невелику кількість ефіру елаїдинової кислоти (3'-гемцитабіну) (0,05 г) виділяють із неочищених фракцій.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 300 МГц) δ: 7,65 (1H, д, ArH), 7,40 (2H, д, NH₂), 6,25 (1H, т, CH-1'), 5,82 (1H, д, ArH), 5,4-5,2 (4H, м, OH-5'), CH=CH і CH-3'), 4,15 (1H, м, CH-4'), 3,85-3,55 (2H, м, CH₂-5'), 2,45 (2H, т, CH₂-COO), 1,95 (2H, м, CH₂-C=), 1,55 (2H, м, CH₂-C-COO), 1,25 (20H, м, CH₂), 0,85 (3H, т, CH₃).

¹³C ЯМР (DMSO-d₆, 75 МГц) δ: 171,70 (COO), 165,69 (C-4), 154,46 (C-2), 141,30 (C-6), 130,10 і 130,03 (C-9"/C-10"), 125,17, 121,72 і 118,27 (т, C-2'), 94,78 (C-5), 83,78 (C-1'), 78,41 (C-4'), 69,93, 69,60 і 69,30 (т, C-3'), 59,15 (C-5'), 32,95, 31,93, 31,26, 28,98, 28,90, 28,81, 28,69, 28,46, 28,28, 28,23, 24,26, 22,09 (CH₂), 13,95 (CH₃).

Приклад 2

Амід елаїдинової кислоти (N⁴)-гемцитабіну

До розчину 2',2'-дифтордезоксирибозифуранозилцитозину (гемцитабіну) (0,38г, 1,3ммоль) у 5мл піридину добавляють хлорангідрид елаїдинової кислоти (0,57г, 1,9ммоль) і реакційну суміш перемішують при

температурі навколишнього середовища протягом 2,5 годин. Розчинник випарюють під високим вакуумом і неочищений продукт очищають на колонці із силікагелем 15% метанолом у хлороформі в якості елююючої системи. Фракції, які містять продукт, випарюють і залишок обробляють ефір-гексаном в ультразвуковому пристрої. Кристалічний матеріал висушують до одержання 0,1г (15%) названої сполуки.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 300 МГц) δ: 10,95 (1H, із, NHCO), 8,25 (1H, д, Ar), 7,25 (1H, д, Ar), 6,30 (1H, д, -OH), 6,15 (1H, т, CH-1'), 5,35 (2H, м, CH=CH), 5,30 (1H, т, -OH), 4,2 (1H, м, CH-4'), 3,9-3,6 (3H, м, CH-3' і CH₂-5'), 2,35 (2H, т, CH₂-CON), 1,95 (2H, м, CH₂-C=), 1,55 (2H, м, CH₂-C-COO), 1,25 (20H, м, CH₂), 0,85 (3H, т, CH₃).

¹³C ЯМР (DMSO-d₆, 75 МГц) δ: 174,06 (CONH), 162,89 (C-4), 154,22 (C-2), 144,69 (C-6), 130,04 (C-9"/C-10"), 122,94 (J_{CF}=259Гц, C-2'), 95,91 (C-5), 84,11 (J_{CF}=31Гц, C-1'), 81,02 (C-4'), 68,35 (J_{CF}=22Гц, C-3'), 58,76 (C-5'), 36,38, 31,94, 31,28, 28,99, 28,83, 28,71, 28,56, 28,48, 28,30, 24,34, 22,10 (CH₂), 13,94 (CH₃).

Переважні похідні гемцитабіну цього винаходу мають більше терапевтичне значення, ніж сам гемцитабін. Це демонструють на двох моделях *in vivo* із як однократними, так і багатократними дозами. При лікуванні однократною дозою вплив похідних виявляється кращим або порівняним із дією гемцитабіну. Це особливо виразно виявляється для амідної похідної, коли чудовий ефект одержують із дозою, яка становить тільки 25% дози гемцитабіну.

При застосуванні багатократної дози різниці в дії похідних гемцитабіну і гемцитабіну виявляються ще більш разючими. Це відбивається як у збільшенні періоду доживання, так і в збільшенні тривалості життя тих, які вижили. Іншою важливою характеристикою є токсичність, яка спостерігається при використанні самого гемцитабіну як у вищих, так і середніх діапазонах багатократного дозування. Хоча ефект, отриманий із низьким нетоксичним діапазоном доз (1мг/кг), вважають гарним, цей ефект перевершують як N⁴-амідні, так і 5'-ефірні похідні. Гемцитабін має оптимальну дію при концентрації в плазмі приблизно 20мкм, але більш високі концентрації, понад 35мкм, інгібують протираковий ефект, що обумовлено механізмом фосфорилювання. (Gandhi, Cellular Pharmacology of Gemcitabine in Gemcitabine: Rationales for Clinical Trial Design and Evaluation, Mini Symposium, 12.3.96, Vrije Universiteit Amsterdam). На відміну від цього, переважні похідні гемцитабіну створюють оптимальні рівні (концентрації) у плазмі гемцитабіну протягом більш тривалого періоду часу без досягнення інгібіторних концентрацій (>35мкм). Це відбувається тому, що похідні не піддаються фосфорилюванню і, мабуть, не беруть участь у механізмі інгібування також.

Головною проблемою лікування раку є розвиток резистентності до терапії. Множинна резистентність до лікарського засобу (MDR) становить одну з головних причин неспроможності в інших випадках ефективних лікарських засобів. Заявники виявляють, що переважні похідні цього винаходу якимось блокують (MDR) і, отже, переборюють цю проблему.

Поглинання клітиною нуклеозидів і нуклеозидних аналогів таких як гемцитабін здійснюється головним чином через селективний рецептор нуклеозидного транспорту (NT=HT).

Модуляцію/інгібування цього рецептора розглядають як резистентність до лікарського засобу в клінічній ситуації. Цей феномен спостерігають *in vitro* при додаванні інгібіторів HT (нуклеозидного транспорту). У цьому проекті виявляють, що на похідні даного винаходу не впливає присутність інгібіторів HT, так як переважні похідні зберігають цитостатичну активність у присутності таких інгібіторів.

Період піврозпаду гемцитабіну в плазмі становить приблизно 10 хвилин внаслідок швидкого його дезамінірування ендogenous ферментом - дезоксицитидиндезаміназою до відповідної похідної урацилу (P.G.Johnston et al, Cancer Chromatography and Biological Response Modifiers, Annual 16, 1996, Chap.1, ed. Pinedo H.M. et al.).

Похідні цього винаходу є поганими субстратами для ферменту, який інактивує, і тому їхній період піврозпаду збільшується. Отже, похідні даного винаходу більш підходять для системного або місцевого лікування злоякісних пухлин, ніж сам гемцитабін.

Нові сполуки цього винаходу не тільки, мабуть, корисні при лікуванні раку, але вони також активні як протівірусні агенти.

Біологія

Експеримент

Цитотоксичну активність амиду гемцитабін-N⁴-елаїдинової кислоти й ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти досліджують на 2 парах гризунів і лініях клітин пухлин людини, кожна з яких складається з вихідної (батьківської) лінії і сублінії або стійкої, або перехресно-стійкої (резистентної) до гемцитабіну.

Клітинні лінії представляють собою лінію A2780 пухлини яєчників людини і сублінію AG6000, яка резистентна до гемцитабіну і характеризується недостатністю дезоксицитидинкінази, і лінію C26A пухлини прямої кишки миші і сублінію C26G із незмінною дезоксицитидинкіназою, але з 10-кратним зниженням тимідинкінази 1. Цитотоксичність кожної сполуки оцінюють, спостерігаючи за безупинною експозицією лікарського засобу протягом 72 годин. Число клітин визначають за допомогою SRB-аналізу і відсоток інгібування росту розраховують для кожної пухлинної лінії як розмір IC₅₀ виражену в мкм, що складає концентрацію сполуки, яка дає збільшення до 50% інгібування росту в порівнянні з контролем.

Результати

Значення IC₅₀ цитотоксичності гемцитабіну, у мкм, у порівнянні з цитотоксичною активністю амиду гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти й ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти представляють у таблиці нижче. Активність похідних гемцитабіну значно вища, ніж цитотоксична активність гемцитабіну в досліджуваних клітинних лініях.

Таблиця

Значення IC₅₀ (мкм) цитотоксичності гемцитабіну, амиду гемцитабін-N⁴-елаїдинової кислоти й ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти в клітинних лініях C26-A, C26-G,

	C26-A	C26-G	A2780	AG6000
Гемцитабін	0,0055	0,0075	0,0005	100
Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	<0,0001	0,0001	<0,0001	35
Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	0,0003	0,0005	<0,0001	100

Цитотоксичну активність гемцитабіну й ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти визначають у СЕМ-клітинах (целюлозно-мембранна клітина) з і без модифікаторів нуклеозидного транспорту нітробензилтіозину (NBMPR) або персантину (піридамолу). Як видно з таблиці (подана нижче), величина IC₅₀ для гемцитабіну виявляється в два рази вищою, ніж IC₅₀ ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти. При додаванні інгібіторів НТ (нуклеозидного транспорту) відбувається десятикратне підвищення величини IC₅₀ для гемцитабіну, у той час як IC₅₀ для ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти змінюється незначно. (1,3-1,5 разів збільшення). У випадку "резистентності", переважне Похідна виявляється в 15-20 разів більш ефективною, ніж вихідний лікарський засіб.

Сполука	IC ₅₀ мкм без інгібітору	IC ₅₀ мкм NBMPR 100 мкм	IC ₅₀ мкм персантин 4 мкг/мл
Гемцитабін	0,11 ±0/01	1,11±0,08	1,26±0,04
Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	0,047±0/006	0,072±0,034	0,065±0,023

Протипухлинна дія аміду гемцитабін-N⁴-елаїдинової кислоти або ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти досліджують in vivo на мишах із двома різними типами пухлин, як з однократної, так і багаторратною дозою.

Вплив аміду гемцитабін-N⁴-елаїдинової кислоти або ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти на Co-26, інокульовану миші внутрішньоселезінково

Самкам мишей Balb/c прищеплюють Co-26 ракову пухлину прямої кишки в селезінку на 0 день. У цій моделі пухлини розвиваються, головним чином, у печінці. Внутрішньочеревну обробку починають з 1 дня. Досліджують дію однократної дози сполуки в порівнянні з однократною дозою гемцитабіну. Фізіологічний розчин використовують у якості контролю.

Кіл-ть мишей	Сполука	Доза мг/кг	Середній час виживання Т/С ^х [%]	Довгостроково залишаються в живих (>35 днів)	Токсична смерть
10	Фізіологічний розчин				
8	Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	25	103,7	5/8	1/8
7	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	75	128,6	1/7	0/7
7	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	100	100,1	4/7	0/7
7	Гемцитабін	75	132,8	2/7	0/7
7	Гемцитабін	100	116,2	4/7	0/7

^хТ/С - токсична концентрація.

Середній час доживання для тварин, які гинуть, розташовується в одній і тій же ділянці для досліджуваних сполук. Амід гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти перевершує ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти і гемцитабін із 5/8 тваринами, які залишилися в живих при дозі тільки 25мг/кг у порівнянні з дозою гемцитабіну 100мг/кг.

У паралельному експерименті введення дози повторюють протягом з 1 по 11 дні.

Кіл-ть мишей	Сполука	Доза мг/кг	Середній час доживання Т/С ^х [%]	Довгостроково залишаються в живих (>46 днів)	Токсична смерть
10	Фізіологічний розчин				
8	Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	1	155	2/8	0/8
8	Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	4	185,6	1/8	0/8
8	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	1	150,6	1/8	0/8
8	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	4	166,9	3/8	2/8
8	Гемцитабін	1	170,6	2/8	1/8
8	Гемцитабін	4	токсич.	0/8	8/8

^xT/C=токсична концентрація.

У цьому експерименті результати, отримані з амідом гемцитабін-N4-елаїдинової кислоти і низькою дозою ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти, виявляються кращими або однаковими з результатами, отриманими з низькою дозою гемцитабіну. Хоча висока доза ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти виявляє деяку токсичність, ця токсичність менша, ніж токсичність при високій дозі самого гемцитабіну.

Вплив одноразових і багаторазових доз аміда-гемцитабін-N⁴-елаїдинової кислоти й ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти на Р-388 клітини, імплантовані внутрішньочеревинно

Самці миші В6D2F1 внутрішньочеревинно імплантують клітини Р 388 лімфатичного лейкоза миші. Обробки починають із 1 дня після імплантації клітин внутрішньочеревинно. Середній період доживання тварин, які залишаються довгостроково в живих і токсичну смерть реєструють після обробки одноразовою дозою й обробки багаторазовою дозою протягом 5 днів, а також обробки багаторазовою дозою протягом 10 днів. Результати представляють у таблиці нижче. Обробка одноразовою дозою ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти ефективна в пролонгуванні часу виживання й в тваринах, які довгостроково залишаються в живих у порівнянні з такою же дозою гемцитабіну.

Обробка одноразовою дозою

Кіл-ть мишей	Сполука	Доза мг/кг	Середній час доживання Т/С [%]	Довгостроково залишаються в живих(>35 днів)	Токсична смерть
9	Фізіологічний розчин				
6	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	75	186,3	1/6	0/6
6	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	100	138,9	0/6	0/6
6	Гемцитабін	75	138,9	0/6	0/6

Обробка багаторазовою дозою, дні 1-4

Кіл-ть мишей	Сполука	Доза мг/кг	Середній час доживання Т/С [%]	Довгостроково залишаються в живих (>35 днів)	Токсична смерть
8	Фізіологічний розчин				
6	Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	1	178	2/6	0/6
6	Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	4	183	1/6	0/6
6	Гемцитабін	15	58,0	0/6	6/6

При застосуванні багаторазової дози протягом 1-4 днів активність аміду гемцитабін-N-елаїдинової кислоти чітко виявляється у відношенні спостережуваних тварин, які довгостроково залишаються в живих і пролонгованого середнього періоду доживання як при дозі 1мг/кг, так і 4мг/кг. У контрольній групі, обробленій гемцитабіном у дозі 15мг/кг, усі тварини гинуть у результаті токсичності.

Обробка багаторазовою дозою, обробка протягом 1-11 днів

Кіл-ть мишей	Сполука	Доза мг/кг	Середній час виживання Т/С [%]	Довгостроково залишаються в живих(>45 днів)	Токсична смерть
9	Фізіологічний розчин				
6	Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	1	172,5	1/6	0/6
6	Амід гемцитабін-N ⁴ -елаїдинової кислоти	4	215,7	0/6	0/6
6	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	1	317,0	0/6	0/6
6	Ефір гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти	4	220,6	2/6	0/6
6	Гемцитабін	1	178,8	0/6	0/6
6	Гемцитабін	4	71,9	0/6	6/6

Обробка протягом 10 днів збільшує протипухлинну активність у порівнянні з більш короткочасною обробкою. Токсичність гемцитабіну, виходячи з мг/кг, виявляється більш високою зі смертністю 6/6 при дозі 4 мг/кг. Відзначають кількість тварин, які довгостроково залишаються в живих після обробки багаторазовою дозою як амідом гемцитабін-N4-елаїдинової кислоти, так і ефіром гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти, а також спостерігають значно збільшений період доживання як для аміду гемцитабін-N⁴-елаїдинової кислоти, так і ефіру гемцитабін-5'-елаїдинової кислоти.

Ефіри або аміди гемцитабіну даного винаходу вводять системно або ентерально, або парентерально.

Для ентерального введення активні сполуки даного винаходу представляють у вигляді, наприклад, м'яких

або твердих желатинових капсул, таблеток, гранул, дрібних гранул або порошків, драже, сиропів, суспензій або розчинів.

Для парентерального введення прийнятні композиції ефірів або амідів гемцитабіну у вигляді розчинів для ін'єкцій або вливань, суспензій або емульсій.

Композиції містять інертні або фармакодинамічно-активні добавки, добре відомі фахівцям у галузі приготування лікарських засобів. Наприклад, таблетки або гранули містять ряд зв'язуючих агентів, наповнювачів, емульгуючих реагентів, носіїв або розріджувачів. Рідкі композиції існують, наприклад, у формі стерильного розчину.

На додаток до активного інгредієнта капсули містять наповнювач або загусник. До того ж, також присутні добавки, які поліпшують смак, як і речовини, звичайно використовувані в якості консервуючих, стабілізуючих, зберігаючих вологість і емульгуючих агентів, солі для зміни осмотичного тиску, буфера й інші добавки.

Дозу, у якій вводять композиції відповідно до даного винаходу, змінюють відповідно до форми застосування і способу застосування, а також потреби пацієнта. Звичайно щоденна доза для системної терапії для дорослого середнього (нормального) пацієнта становить приблизно 0,1-150 мг/кг ваги тіла/день, переважно 1-40 мг/кг день. Для місцевого введення мазі, наприклад, містять від 0,1 до 10% за вагою фармацевтичної композиції, особливо 0,5-5% за вагою.

Якщо необхідно, фармацевтична композиція, яка містить ефіри й амідів гемцитабіну, містить антиоксидант, наприклад, токоферол, N-метил-токофермін, бутиловий гідроціанізол, аскорбінову кислоту або бутиловий гідрокситолуол.

Також передбачають проведення комбінованої терапії, тобто терапії, при якій введення гемцитабінового ефіру або амиду даного винаходу здійснюють у сполученні з іншими видами лікування, наприклад, хірургією, опроміненням і хіміотерапією. Наприклад, для переважного лікування пухлин мозку застосовують сполучення хірургічного лікування і лікування гемцитабіновим ефіром або амідом цього винаходу за допомогою системного або місцевого введення.