



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86119** (13) **C2**  
(51) **МПК (2009)**  
**C07H 19/073** (2006.01)  
**A61P 35/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

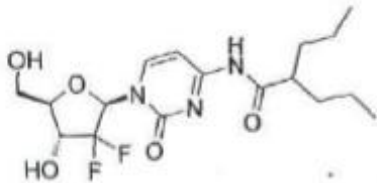
ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) АМІДНІ ПРОЛІКИ ГЕМЦИТАБІНУ, ЇХ КОМПОЗИЦІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ**

1

(21) а200706706  
(22) 30.11.2005  
(24) 25.03.2009  
(86) РСТ/US2005/043125, 30.11.2005  
(31) 60/637,422  
(32) 17.12.2004  
(33) US  
(46) 25.03.2009, Бюл.№ 6, 2009 р.  
(72) БЕНДЕР ДЕЙВІД МАЙКЛ, РЕМІК ДЕЙВІД МАЙКЛ  
(73) ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ  
(56) WO 2004/041203 A2, 21.05.2004  
WO 98/32762 A1, 30.07.1998  
(57) 1. Сполука формули



2. Сполука, яка є змішаним кристалом 1-(2,2-дифтор-2-деокси-β-D-рибофуранозил)-4-(2-пропіл-1-оксопентил)амінопіримідин-2-ону та n-толуолсульфонової кислоти.  
3. Сполука за п. 2, яка є змішаним кристалом 1-(2,2-дифтор-2-деокси-β-D-рибофуранозил)-4-(2-пропіл-1-оксопентил)амінопіримідин-2-ону та гідрату n-толуолсульфонової кислоти (2:1:1).

2

4. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким з пп. 1-3 та фармацевтично прийнятний наповнювач.  
5. Фармацевтична композиція за п. 4, яка має кишковорозчинне покриття.  
6. Спосіб лікування чутливих новоутворень у ссавців, який включає введення в організм ссавця, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-3.  
7. Спосіб за п. 6, де чутливе новоутворення вибрано з групи, яку складають лімфома Т-лімфоцитів, саркома м'яких тканин, рак підшлункової залози, рак молочної залози, злоякісний лімфоматоз, незлоякісний лімфоматоз, недрібноклітинний рак легенів, рак яєчників та рак сечового міхура.  
8. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-3 для виготовлення лікарського засобу для лікування чутливих новоутворень.  
9. Сполука, вибрана з-поміж сполук за будь-яким з п. 1, п. 2 або п. 3, для застосування як лікарський засіб.  
10. Застосування сполуки, вибраної з-поміж сполук за будь-яким з п. 1, п. 2 або п. 3, для виготовлення лікарського засобу для лікування лімфоми Т-лімфоцитів, саркоми м'яких тканин, раку підшлункової залози, раку молочної залози, злоякісного лімфоматозу, незлоякісного лімфоматозу, недрібноклітинного раку легенів, раку яєчників та раку сечового міхура.

Цей винахід стосується нового виду проліків гемцитабіну, які придатні для перорального застосування, проходячи через кишковий тракт у ворітний кровотік практично без розкладу при нижчій токсичності для шлунково-кишкового тракту та підвищеній біодоступності у порівнянні з вихідною лікарською речовиною та зберігаючи ефективність вихідної лікарської речовини при менших дозах.

Гідрохлорид гемцитабіну (гідрохлорид 2',2'-дифтор-2'-деоксицитидину) є протипухлинним агентом з відомою антивірусною дією, який на даний час випускається та постачається на ринок під

назвою Gemzar® у формі ліофілізованої порошкоподібної композиції для лікування різних видів раку. Gemzar®, спосіб його виготовлення та способи його використання описані у патентах США №5,464,826 та №4,808,614. Gemzar® на даний час дозволений для застосування при лікуванні раку підшлункової залози, раку молочної залози та недрібноклітинного раку легенів (NSCLC) та знаходиться у процесі випробування при лікуванні раку яєчників. Крім того, Gemzar® можна застосовувати при лікуванні вірусного гепатиту С (HCV), а також як модулятор імунної функції [див. патент США

(13) **C2**

(11) **86119**

(19) **UA**

№6,555,518]. На даний час Gemzar® застосовують шляхом внутрішньовенної інфузії у дозі приблизно від 1000мг/м<sup>2</sup> до 1250мг/м<sup>2</sup> на протязі 30хв один раз на тиждень протягом до 7 тижнів, після чого лікування припиняють на тиждень для відпочинку пацієнта.

Застосування гемцитабіну пероральним шляхом може бути обмежене його низькою біодоступністю при пероральному введенні, яка є наслідком метаболізму при першому проходженні. [Дивись Шиплі та ін. - L.A. Shipley et. al., "Метаболізм та розподіл гемцитабіну, онколітичного аналога деоксицитидину, в організмі мишей, пацюків та собак", *Drug Metabolism & Disposition*. 20(6): 849-855, 1992]. Крім того, при пероральному застосуванні гемцитабіну виникають ускладнення, оскільки він викликає негативні ефекти, що вимагають обмеження дози; вони полягають в ураженнях кишкового тракту, що характеризуються помірною або навіть значною втратою слизового епітелію (атрофічною ентеропатією) по всій довжині кишкового тракту у мишей, які одержували шляхом згодовування одну дозу [167мг/кг, 333мг/кг або 500мг/кг] гемцитабіну [Гортон та ін. - N.D. Horton et.al., «Metabolism and disposition of gemcitabine, and oncolytic deoxycytidine analog, in mice, rats, and dogs», American Association for Cancer Research, Poster Presentation, Orlando, FL, March 27-31, 2004]. Порівнянні дози при внутрішньовенному введенні не викликали смерті або токсичності для шлунково-кишкового тракту у вищезгаданому дослідженні на мишах.

Способи виготовлення проліків та композицій для пролонгованого вивільнення гемцитабіну добре відомі в галузі. Приклади таких проліків та композицій з пролонгованим вивільненням можна знайти у заявках WO 04/0412303 "Gemcitabine Prodrugs, Pharmaceutical Compositions and Uses Thereof" на ім'я Геллопа та ін. [Gallor et al.]; WO 98/32762 "Gemcitabine Derivatives" на ім'я Мірена та ін. [Myhren et al.]; WO 02/09768 "Therapeutic polyesters and polyamides" на ім'я Уріха (Uhrich); WO 02/76476 "Terminally-branched polymeric linkers and polymeric conjugates as prodrug" на ім'я Грінудда та ін. [Greenwald et al.]; WO 02/65988 "Terminally-branched polymeric linkers and polymeric conjugates as prodrug" на ім'я Чоу та ін. [Choe et al.].

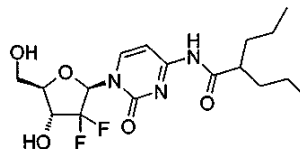
Амідні похідні гемцитабіну описано у галузевій літературі як корисні проміжні продукти синтезу гемцитабіну [дивись, наприклад, Бріттон та ін. - Britton et al., патент США №5,420,266, та Грінді та ін. - Grindley et al., патент США №5,464,826], а також корисні як групи проліків для застосування гемцитабіну [дивись, наприклад, Геллоп та ін. - Gallor et al., заявка з WO 04/041203].

Продовжує існувати потреба у проліках гемцитабіну, які уможливили б пероральне застосування, проходили б через кишковий тракт без істотного розкладу та забезпечували б постачання гемцитабіну в уражений захворюванням орган при прийнятному рівні безпечності та ефективності.

Автори цього винаходу несподівано відкрили нову амідну похідну гемцитабіну, яка проходить через ентероцити практично без пошкодження; гідролізується до гемцитабіну без значного нагро-

мадження деоксифторуридину (dFdU), який є переважним метаболітом гемцитабіну в печінці; має при пероральному введенні нижчу токсичність, ніж гемцитабін; та зберігає відповідні профілі ефективності та безпечності при пероральному застосуванні.

Цей винахід пропонує сполуку формули I



# I.

Відповідно до іншого аспекту, цей винахід пропонує нові фармацевтичні композиції, які включають сполуку формули I та один або кілька фармацевтично прийнятних наповнювачів.

Цей винахід пропонує також застосування сполуки формули I для лікування чутливих новоутворень у ссавців, які потребують такого лікування.

Цей винахід пропонує застосування сполуки формули I для лікування чутливих вірусних інфекцій у ссавців, які потребують такого лікування.

Цей винахід пропонує також застосування сполуки формули I для виготовлення лікарських засобів для лікування чутливих новоутворень або вірусних інфекцій.

Крім того, цей винахід пропонує також спосіб одержання сполуки формули I.

Детальний опис винаходу

Терміни, які вживаються у цьому описі, мають вказані нижче значення.

Термін "ссавець" вживається для позначення будь-якої з різноманітних теплокровних хребетних живих істот класу Mammalia, найбільш переважно людей, які характеризуються наявністю волоссяного покриву на шкірі та наявністю у самок грудних залоз, які продукують молоко для вигодовування дитинчат.

Термін "фармацевтично прийнятний наповнювач" означає фармацевтично прийнятний носій, розчинник або домішку, призначений для покращення характеристик фармацевтичної композиції. Такі наповнювачі мають бути сумісними з іншими інгредієнтами композиції та нешкідливими для істоти, в організм якої вводиться композиція, і добре відомі фахівцям у галузі; дивись, наприклад, монографію Ремінгтона [Remington's Pharmaceutical Sciences, 19<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Company, 1995].

Термін "змішаний кристал" означає фізичну асоціацію двох або кількох молекул, стабільність якої забезпечується нековалентною взаємодією. Один або кілька компонентів цього молекулярного комплексу забезпечують стабільну систему у кристалічних ґратах. У деяких випадках домішкові молекули включаються у кристалічні ґрати у формі дегідратів або сольватів; дивись, наприклад, публікацію Альмарассона та ін. "Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases. Do Pharmaceutical Co-crystals Represent a New Path to Improved Medicines?" [Almarasson O., et. al., The

Royal Society of Chemistry, 1889-1896, 2004]. Змішані кристали, яким віддається перевага, включають *p*-толуолсульфонову кислоту та бензолсульфонову кислоту.

Термін "фармацевтично прийнятний змішаний кристал" означає змішаний кристал, сумісний з іншими інгредієнтами композиції та нешкідливий для істоти, в організм якої вводиться композиція.

Термін "чутливе новоутворення" означає аномальний ріст тканини в організмі ссавців, який піддається лікуванню шляхом перорального застосування сполуки формули I. Оскільки ці проліки гідролізуються до гемцитабіну, то очікується, що застосування цих проліків буде характеризуватися широким спектром активності стосовно різноманітних типів як твердих, так і нетвердих пухлин. До чутливих новоутворень переважно належать лімфома Т-лімфоцитів, саркома м'яких тканин, рак підшлункової залози, рак грудної залози, злоякісний лімфоматоз, незлоякісний лімфоматоз, недрібноклітинний рак легенів, рак яєчників та рак сечового міхура.

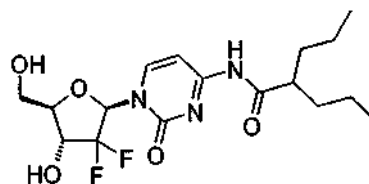
Сполуки за цим винаходом корисні при лікуванні вірусних інфекцій, зокрема, вірусного гепатиту С (HCV).

Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість сполуки або композиції, яка спричиняє бажану біологічну або медичну реакцію тканини, системи або організму ссавця, якої домагається дослідник, медик або клініцист.

Гемцитабін містить три функціональні групи, які піддаються дериватизації, а саме 3'- та 5'-гідроксильні групи та N4-аміногрупу. Сполуку формули I можна одержати, застосовуючи відповідні групи захисту для блокування 3'- та 5'-гідроксильних груп з подальшим ацилюванням N4-аміногрупи. Типові групи захисту, добре відомі та загальноприйняті у галузі, описані в монографії Гріні та Вутса "Групи захисту в органічному синтезі" [Protecting Groups in Organic Synthesis, 3<sup>rd</sup> edition, Theodora Greene, Peter Wuts (Wiley-Interscience) 1999]. Ацилювання Ж-аміногрупи можна виконати шляхом проведення реакції з хлорангідридом або ангідридом карбонової кислоти або з карбоною кислотою у присутності агента сполучення, наприклад, N,N-дициклогексилкарбодіїміду (DCC), N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодіїміду (EDC), 1,1-карбоніл-діїмідазолу (CDI) або інших аналогічних реагентів, добре відомих фахівцям у галузі органічної хімії. За альтернативним способом, сполуку формули I можна одержати без застосування груп захисту. У такому випадку утворюються суміші моно-, ди- та триадуктів, і бажаний продукт можна виділити з такої суміші.

Подані нижче приклади ілюструють синтез сполук за цим винаходом. Усі вихідні матеріали та реагенти добре відомі та прийняті в галузі та є наявними на ринку або можуть бути без утруднень одержані способами, описаними у цій заявці. Спосіб одержання гемцитабіну (2',2'-дифтор-2'-деоксидитидину) розкрито, наприклад, у патенті №4,808,614.

Приклад 1



1-(2,2-дифтор-2-деокси-*b*-D-рибофуранозил)-4-(2-пропіл-1-оксопентил)-амінопіримідин-2-он

Розчиняли 2',2'-дифтор-2'-деоксидитидин (10,0г, 38,0ммоль) у безводному піридині (100мл) та охолоджували до 0°C при перемішуванні в атмосфері азоту. Додавали краплями хлортриметилсилан (24,0мл, 190,0ммоль), підтримуючи внутрішню температуру суміші нижче 5°C. Продовжували перемішування при 0°C протягом 2год. В окремій колбі розчиняли 2-пропілпентанову кислоту (6,0г, 41,8ммоль) у безводному ацетонітрилі (100мл). Додавали невеличкими порціями 1,1-карбонілдіїмідазол (6,8г, 41,8ммоль) протягом 30хв та перемішували протягом 2год. Додавали цей ацетонітрильний розчин краплями до піридинового розчину при 0°C та давали реакційній суміші нагрітись до температури навколишнього середовища. Нагрівали реакційну суміш при 45°C протягом ночі, потім охолоджували до 30-35°C, додавали 100мл абсолютного етанолу та нагрівали при 45°C протягом 30хв. Додавали 50мл води, та нагрівали при 45°C протягом 5год, після чого охолоджували до температури навколишнього середовища та концентрували у вакуумі. Неочищений залишок розподіляли між етилацетатом та водою. Підкислювали до pH~2 фосфорною кислотою, та відділяли органічний шар. Водний шар екстрагували додатковою кількістю етилацетату. Об'єднували органічні розчини, промивали насиченим розчином бікарбонату натрію та насиченим розчином хлориду натрію, сушили над сульфатом магнію та концентрували у вакуумі. Очищали хроматографією на силікагелі (120г) при елююванні градієнтом від 30% до 60% етилацетату у дихлорметані. Виділяли бажаний продукт у вигляді білої крихкої піни (11,2 г, вихід 77%).

MS (ES):  $m/z$  390,3=[M+H]<sup>+</sup>.

MS (ES):  $m/z$  388,3=[M-H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 0,83 (t, 6H), 1,15-1,36 (m, 6H), 1,46-1,55 (m, 2H), 2,60 (dddd, 1H, J=14,4Гц, 9,6Гц, 5,6Гц, 5,6Гц), (ddd, 1H, J=12,6Гц, 6,2Гц, 3,6Гц), 3,77-3,81 (m, 1H), 3,87 (dt, 1H, J=8,4, 3,0 Гц), 4,12-4,22 (m, 1H), 5,27 (t, 1H, J=5,6 Гц), 6,15 (t, 1H, J=7,4Гц), 6,29 (d, 1H, J=6,4Гц), 7,31 (d, 1H, J=7,2Гц), 8,23 (d, 1H, J=8,0Гц), 11,03 (s, 1H).

Приклад 2

Змішаний кристал гідрату 1-(2,2-дифтор-2-деокси-*b*-D-рибофуранозил)-4-(2-пропіл-1-оксопентил)-амінопіримідин-2-ону з *p*-толуолсульфоновією кислотою (2:1:1)

Розчиняли 0,709г (1,82ммоль) сполуки за Прикладом 1 у 9мл метанолу. В окремій колбі готували вихідний 0,25М водний розчин *p*-толуолсульфоновією кислоти. Додавали краплями 3,6мл (0,9ммоль) цього водного розчину. Додавали приблизно 5 мл води, і перемішували суміш при кімнатній температурі (~30хв) до випадання осаду.

Осаджену тверду речовину відділяли фільтруванням під вакуумом та сушили на повітрі.

Аналітичний аналіз змішаного кристалу:

Готували розчини п-толуолсульфонової кислоти, гемцитабіну та сполуки за Прикладом 1 відомих концентрацій. Аналізували пробу змішаних кристалів п-толуолсульфонової кислоти для визначення компонентного складу.

Для співвідношення N-(2-пропіл-пентаноїл)]-2',2'-дифтор-2'-деокси-цитидин/п-толуолсульфорова кислота/вода 2:1:1 визначали відсоток п-толуолсульфонової кислоти:

теоретично 17,8% п-толуолсульфонової кислоти;

знайдено 19,1% п-толуолсульфонової кислоти.

PXBE:

Колонка: Waters Atlantis dC18, 3,0мкм, внутрішній діаметр 4,6мм, довжина 150мм.

Температура колонки 50°C.

УФ-детектор, довжина хвилі UV248 нм.

1) Рухома фаза

A. 5/95 ацетонітрил/вода + 0,1% тетрафтороцтової кислоти (TFA)

B. 50/50 ацетонітрил/вода + 0,1% TFA

2) Градієнт

Час (хв)	Розчинник % A	% B
0	100	0
5	0	100
8	0	100
8,01	100	0
11	кінець циклу	

Приклад 3

Змішаний кристал гідрату 1-(2,2-дифтор-2'-деокси-β-D-рибофуранозил)-4-(2-пропіл-1-оксопентил)амінопіримідин-2-ону з бензолсульфоровою кислотою (1:1)

До 5мл етилацетату додавали 550мг сполуки за Прикладом 1. Нагрівали суміш приблизно до 55°C. Додавали 1 молярний еквівалент бензолсульфорової кислоти у формі вихідного розчину. Додавали додатково приблизно 10мл етилацетату, в разі потреби при обробленні ультразвуком для подрібнення осаду. Суспензії давали охолонути до кімнатної температури, та відділяли тверду фазу фільтруванням під вакуумом. Одержаний продукт сушили на повітрі.

Т.пл. 171°C.

Сполука формули I та її сольвати придатні для перорального застосування та за нормальних умов застосовуються перорально, таким чином, пероральному застосуванню віддається перевага.

Фармацевтичні композиції виготовляють способами, добре відомими у фармацевтичній галузі. Носієм або наповнювачем може бути твердий, напівтвердий або рідкий матеріал, який може відігравати роль носія або середовища для активного інгредієнта. Придатні носії або наповнювачі добре відомі в галузі. Фармацевтична композиція може бути пристосована для перорального, інгаляційного, парентерального або місцевого використання та може вводитися в організм пацієнта у формі таблеток, капсул, аерозолів, інгаляційних препаратів, супозиторіїв, розчинів, суспензій тощо. Сполу-

ки за цим винаходом можна вводити в організм пероральним шляхом, наприклад, спільно з інертним розріджувачем або у капсулах, або у пресованій формі (таблетках). Для цілей терапевтичного застосування згадані сполуки можуть бути введені в наповнювачі та застосовуватися у формах таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, вафель, жувальних гумок тощо. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, ці препарати містять як активний інгредієнт щонайменше 1% сполуки за цим винаходом, але вміст згаданої сполуки може варіювати залежно від конкретної форми та може становити від 1% до приблизно 90% маси одиниці лікарської форми. Кількість сполуки, присутньої в композиції, має бути такою, щоб забезпечити відповідне дозування. Композиції та препарати за цим винаходом, яким слід віддавати перевагу, можна визначити способами, добре відомими фахівцям.

Таблетки, пілюлі, капсули, пастилки тощо можуть також містити одну або кілька перелічених нижче допоміжних речовин: в'язучих, наприклад, повідону, гідроксипропілцелюлози, мікрокристалічної целюлози або желатину; наповнювачів або розріджувачів, наприклад, крохмалю, лактози, мікрокристалічної целюлози або дикальційфосфату; розпушувальних речовин, наприклад, кроскармелози, кросповідону, крохмальгліколяту натрію, кукурудзяного крохмалю тощо; змащувальних агентів, наприклад, стеарату магнію, стеаринової кислоти, тальку або гідрогенізованих рослинних олій; ковзних агентів, наприклад, колоїдного діоксиду кремнію; змочувачів, наприклад, лаурилсульфату натрію та полісорбату-80; та підсолоджувачів, наприклад, сахарози, аспартаму або сахарину, або смакоароматичних домішок, наприклад, м'яти, метилсаліцилату або апельсинового ароматизатора. Якщо формою дозованої одиниці є капсула, то вона може містити, на додаток до матеріалів вищезгаданих типів, рідкий носій, наприклад, поліетиленгліколь або олію. Інші форми дозованих одиниць можуть містити різноманітні інші матеріали, які модифікують фізичну форму дозованої одиниці, наприклад, покриття. Перевага віддається дозованим формам з кишковорозчинним покриттям.

Таким чином, таблетки або пілюлі можуть бути покриті оболонками з цукру, гідроксипропілметилцелюлози, поліметакрилатів або інших покривних речовин. Сиропи можуть містити, окрім активних сполук, сахарозу як підсолоджувач та певні консерванти, барвники та пігменти, а також ароматизатори. Матеріали, що застосовуються при виготовленні цих різноманітних композицій, мають бути фармацевтично чистими та нетоксичними у застосовуваних кількостях.

Сполуки формули I, як правило, ефективні у широкому діапазоні дозування. Наприклад, добові дози (у формі однієї дози або кількох часткових доз) за нормальних умов лежать у межах від приблизно 15мг/добу до приблизно 200мг/добу, більша перевага віддається дозам приблизно 85мг/добу. У деяких випадках більш ніж адекватними можуть бути рівні дозування, нижчі від нижньої межі вищезазначеного діапазону, тоді як в

інших випадках без будь-яких шкідливих побічних ефектів можуть застосовуватися ще більші дози, і, отже, вищезазначений діапазон дозування не призначений для будь-якого обмеження обсягу цього винаходу. Мається на увазі, що реальну застосовувану кількість сполуки визначає лікар з урахуванням релевантних обставин, у тому числі стану, що підлягає лікуванню, обраного шляху введення, конкретної застосовуваної сполуки чи сполук, віку, маси тіла та індивідуальної реакції пацієнта та тяжкості симптомів захворювання у пацієнта.

Випробування хімічної стабільності при різних значеннях pH

Хімічну стабільність при різних значеннях pH випробовували із застосуванням напівавтоматичної PXBE. Виготовляли проби сполуки формули I у концентрації 100мг/мл у п'яти буферних розчинах, які відповідали діапазону pH у шлунково-кишковому тракті (pH1-pH8). Проби вміщували в автоматичний пристрій введення проб для PXBE, в якому підтримували температуру 40°C. Проби повторно вводили у колонку для PXBE через годинні інтервали на протязі періоду до 24год, використовуючи колонку для PXBE, яка забезпечувала відділення сполуки формули I від гемцитабіну. Для визначення стабільності контролювали зміни площі піка сполуки формули I у часі за допомогою УФ детектора та зіставляли одержані значення з початковою площею піка.

Через 4год у діапазоні pH1-8 розкладалося з утворенням гемцитабіну менше ніж 25% сполуки за Прикладом 1.

Фармакокінетичні випробування

Фармакокінетика в організмі мишей

Фармакокінетичні профілі гемцитабіну та сполуки формули I визначали з використанням самців мишей лінії CD-1 після перорального введення у дозах, які відповідали приблизно 10мг/кг гемцитабіну. Піддослідних тварин (n=3 для кожного значення часу, дози та сполуки) умертвляли через 0,08год, 0,25год, 0,5год, 1год, 2год та 6год після введення дози та відбирали системні проби крові в оброблені EDTA пробірки, які містили тетрагідроуридин (кінцева концентрація у крові 0,5мМ) для запобігання подальшого метаболізму гемцитабіну. У момент часу 0,08год умертвляли додатково 3 тварини для збирання крові на вході печінки. Плазму відділяли центрифугуванням та зберігали до аналізу в замороженому вигляді. Концентрації гемцитабіну та проліків у плазмі визначали комбінованим методом рідинної хроматографії та мас-спектрометрії (LC/MS/MS). Фармакокінетичні параметри обчислювали, застосовуючи програмне забезпечення WinNonlin [Pharsight Corp., Mountain View, CA]. Фармакокінетичні параметри кожного виду проліків зіставляли з параметрами, визначеними для випадку перорального введення гідрохлориду гемцитабіну із застосуванням аналогічної схеми експерименту.

Сполука за Прикладом 1, введена перорально мишам лінії CD-1, екстенсивно гідролізувалася *in vivo* з вивільненням гемцитабіну. Кількість гемцитабіну у плазмі мишей лінії CD-1 при введенні сполуки за Прикладом 1 збільшувалася у порівнянні з випадком безпосереднього перорального введен-

ня гідрохлориду гемцитабіну. Засвоєння неушкоджених проліків підтверджується відносно високими концентраціями сполуки за Прикладом 1 у плазмі крові, взятої на вході печінки через 0,08год після перорального введення.

Фармакокінетичне випробування на мавпах

Визначали фармакокінетичні профілі гемцитабіну та сполуки формули I в організмі мавп виду *Cynomolgus* після перорального та внутрішньовенного введення за перехресною схемою експерименту. Сполуки вводили у дозах, які відповідали приблизно 10мг/кг гемцитабіну. Відбирали проби крові в оброблені EDTA пробірки, які містили тетрагідроуридин (кінцева концентрація у крові 0,5мМ) у визначені моменти часу на протязі інтервалу до 48год. У періоди перорального введення тварин попередньо обробляли ранітидином (внутрішньовенно, 5мг/кг). Плазму відділяли центрифугуванням та зберігали до аналізу в замороженому вигляді. Концентрації гемцитабіну та сполуки формули I у плазмі визначали комбінованим методом LC/MS/MS. Фармакокінетичні параметри обчислювали, застосовуючи програмне забезпечення WinNonlin [Pharsight Corp., Mountain View, CA].

Сполука за Прикладом 1, введена внутрішньовенно мавпам виду *Cynomolgus*, екстенсивно гідролізувалася *in vivo* з вивільненням гемцитабіну. Кількість гемцитабіну в організмі мавп виду *Cynomolgus* при пероральному введенні Сполуки за Прикладом 1 збільшувалася приблизно у 5 разів у порівнянні з випадком безпосереднього перорального введення гідрохлориду гемцитабіну.

Випробування гідролізу

Проба на гомогенаті тонкої кишки

Для визначення стійкості сполуки формули I до ферментного гідролізу у кишечнику виготовляли неочищені гомогенати клітин епітелію тонкої кишки з відрізків верхнього відділу тонкої кишки мишей лінії CD-1, собак-гончаків, мавп виду *Cynomolgus* та людини. Гомогенати з організмів мишей та собак виготовляли зі свіжовиділених тканин, а гомогенати з організмів мавпи та людини - з попередньо заморожених тканин. Клітини обережно зіскрібали з відрізків кишок, нагромаджували та гомогенізували у 50мМ ацетатному буфері, застосовуючи прилад Polytron (PT-10-85). Концентрації протеїнів визначали стандартним спектрофотометричним способом. Виготовлені гомогенати зберігали до використання при -70°C.

Швидкість гідролізу сполуки формули I у гомогенатах тонкої кишки (SIH) визначали шляхом інкубування сполуки формули I (100мкМ) з SIH (загальна концентрація протеїнів 2,5-5мг/мл) в ацетатному буфері при pH 7,5 протягом часу до 6год. Концентрації гемцитабіну, вивільненого внаслідок гідролізу, визначали методом LC/MS після гасіння реакції ацетонітрилом. Швидкість гідролізу обчислювали для моменту часу 30хв при скринінгових експериментах та з нахилу лінійної частини кривих часової залежності ступеню гідролізу при дослідженні характеристик сполуки формули I.

Сполука за Прикладом 1 у пробі на гомогенаті тонкої кишки виявила низьку швидкість гідролізу. Найповільніший гідроліз виявлено у гомогенатах мавп та людини, де після 6год інкубування у гем-

цитабін перетворювалося менше ніж 3% загальної кількості сполуки.

Проба на гідроліз у фракції S9 печінки

Гідроліз сполуки формули I ферментами печінки визначали у випробуванні на гідроліз у печінці. Виготовляли гомогенати печінки мишей лінії CD-1, собак-гончаків, мавп виду *Сynomolgus* та людини. Печінкову тканину різали на дрібні шматки за допомогою ножиць, після чого гомогенізували у 50мМ ацетатному буфері протягом 1хв, застосовуючи прилад Polytron (PT-10-85). З кожної проби виготовляли пост-мітохондріальні фракції (S9) шляхом ультрацентрифугування при 9000g при температурі 4°C протягом 10хв. Фракції S9 печінки мишей, собак та мавп виготовляли зі свіжовидібраних тканин, а фракції S9 людської печінки - з попередньо замороженої тканини. Після центрифугування збирали надсадову рідину та визначали концентрації протеїнів стандартним спектрофотометричним способом. Виготовлені фракції S9 зберігали до використання при -70°C.

Швидкість гідролізу сполуки формули I у фракціях S9 печінки визначали шляхом інкубування сполуки формули I (10мкМ) з S9 (загальна концентрація протеїнів 2мг/мл) у сольовому розчині із фосфатним буфером при pH8,0 протягом часу до 6год. Концентрації гемцитабіну, вивільненого внаслідок гідролізу, визначали методом LC/MS після гасіння реакції ацетонітрилом. Швидкість гідролізу обчислювали для моменту часу 30хв при скринінгових експериментах та з нахилу лінійної частини кривих часової залежності ступеня гідролізу при дослідженні характеристик сполуки формули I.

Сполука за Прикладом 1 гідролізувалася у фракціях S9 усіх вищезазначених організмів. Найшвидший гідроліз виявлено у гомогенатах мавп та людини, де після 6год інкубування у гемцитабін перетворювалося понад 35% загальної кількості сполуки.

Токсикологічні випробування

Чотиридобовий скринінг на мишах

Для визначення токсичності, що спричиняє сполука формули I при щоденному пероральному введенні самкам мишей лінії CD-а на протязі 4 днів, профілі шлунково-кишкової токсичності сполуки формули I зіставляли з попередніми результатами дослідження шлунково-кишкової токсичності при пероральному введенні гемцитабіну у дозі 8мг/кг мишам на протязі 4 днів.

Самкам мишей лінії CD-1 у віці 5-8 тижнів вводили шляхом згодовування дози сполуки формули I. Рівень дози було добрано так, що він відповідав за молярним еквівалентом 8мг/кг гемцитабіну. Застосовували об'єм дози 10мл/кг, і дози вводили один раз на день протягом 4 послідовних днів. Приблизно через 5-8год після четвертої дози виконували аутопсію.

Оцінювали клінічні прояви, клінічну хімію, загальну патологію та обмежену гістопатологію (клубова кишка, порожня кишка та печінка). Після введення мишам сполуки за Прикладом 1 в еквівалентній дозі спостерігалось значне зниження тяжкості атрофічних змін або ентеропатії у порівнянні з гідрохлоридом гемцитабіну.

14-добове дослідження на мишах

14-добове дослідження на мишах виконували з метою визначення наявності або відсутності негативного впливу сполуки формули I на організм мишей після 14 днів перорального введення (згодовування) та визначення концентрацій сполуки формули I та її метаболітів - гідрохлориду гемцитабіну та деоксидифторуридину - у плазмі після 1 дози або 14 доз.

Самцям та самкам мишей лінії CD-1 у віці 9-12 тижнів вводили шляхом згодовування дози сполуки формули I. Діапазон доз вибирали з розрахунком на визначення максимальної переносної дози та токсичності, що обмежує дозу. Застосовували об'єм дози 10мл/кг, і дози вводили один раз на день.

Оцінювали клінічні прояви, масу тіла, споживання корму, гематологію, клінічну хімію, концентрації сполуки формули I та її метаболітів - гідрохлориду гемцитабіну та деоксидифторуридину - у плазмі та патологію (у тому числі загальну патологію, масу органів та гістопатологію).

Сполука за Прикладом 1 при введенні в молярно еквівалентних дозах спричиняє меншу ентеропатію, ніж гідрохлорид гемцитабіну, при приблизно подвоєному системному впливі у порівнянні з гідрохлоридом гемцитабіну.

7-добове дослідження на собаках

7-добове дослідження на собаках виконували з метою визначення профілю токсичності сполуки формули I при введенні собакам-гончакам протягом 7 днів та визначення концентрацій сполуки формули I та її метаболітів - гідрохлориду гемцитабіну та деоксидифторуридину - у плазмі після 1 дози або 7 доз.

Самцям та самкам собак-гончаків у віці 6-48 місяців вводили перорально сполуку формули I за допомогою капсул. Діапазон доз вибирали з розрахунком на визначення максимальної переносної дози та токсичності, що обмежує дозу. Застосовували об'єм дози 1 мл/кг, і дози вводили один раз на день.

Оцінювали клінічні прояви, масу тіла, споживання корму, температуру тіла, гематологію (у тому числі коагуляцію), клінічну хімію, дослідження сечі, концентрації сполуки формули I та її метаболітів - гідрохлориду гемцитабіну та деоксидифторуридину - у плазмі та патологію (у тому числі загальну патологію, масу органів та гістопатологію). Гемотоксичність та інші види токсичності, у тому числі gl-токсичність, відповідали характеристикам, описаним раніше для парентерального застосування гемцитабіну. Таким чином, жодний із цих проявів токсичності не є специфічним для перорального введення.

Випробування in vivo

Клітини пухлини товстої кишки HCT-116 вирощували in vitro у стандартних умовах культивування тканини, збирали, промивали, та  $5 \times 10^6$  клітин [суспензія 1:1 у середовищі Matrigel, Collaborative Biomedical Products, Inc.] вводили підшкірно у задню частину боку самок безшерстих мишей (одержаних від фірми Charles River, лінія CD-1 nu/nu, маса тіла 24-27г, опромінені дозою 450 рад в межах інтервалу 24год після імплантації). Перед початком лікування пухлином давали вирости до

об'єму приблизно  $100\text{мм}^3$ . Мишам згодовували (в об'ємі  $10\text{мл/кг}$ ) носій (контроль), сполуку формули I або гідрохлорид гемцитабіну у різних дозах у моменти часу, вказані в описі індивідуальних експериментів. Сполуки вводили або щоденно протягом 14 днів, або через день при загальній кількості 7 доз, або кожного третього дня при загальній кількості 4 дози. Для режиму щоденного дозування сполуку формули I розчиняли у  $100\text{мМ}$  фосфатно-натрієвому буфера,  $\text{pH}6,0$ , а для режимів дозування через день та через два дні вводили до складу композиції, що містила 1% натрієвої карбоксиметилцелюлози, 0,5% лаурилсульфату натрію, 0,05% протиспінювача Antifoam 150 та 0,085% повідону. Гідрохлорид гемцитабіну для перорального введення розчиняли у фізіологічному сольовому розчині. Розміри пухлини вимірювали за допомогою

кронциркуля, і об'єм пухлини ( $\text{мм}^3$ ) визначали за формулою  $l \times w^2 \times 0,536$ , де  $l$  - більший, а  $w$  - менший із двох взаємно перпендикулярних розмірів. Усі дані (розміри пухлин та маса тіла тварин) визначали двічі на тиждень, починаючи з початку лікування, та аналізували за допомогою комп'ютеризованої системи вимірювання пухлин.

Протипухлинна ефективність, що спостерігалася при застосуванні сполуки за Прикладом 1, була порівнянною з ефективністю, що досягалася при застосуванні еквівалентних доз гідрохлориду гемцитабіну. Однак лікування сполукою за Прикладом 1 спричиняло нижчу загальну токсичність у порівнянні з показниками для тварин, які одержували еквівалентну кількість гідрохлориду гемцитабіну.